

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

**ПРОЯВЛЕНИЕ ПОЛИЭМБРИОНИИ У РАЗНЫХ ЛИНИЙ
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Ушаковой Анны Александровны

Научный руководитель

доцент, к.б.н.

08.06.2019г. Т.А.Алаторцева

Научный консультант:

ведущий биолог лаборатории

биотехнологии

и репродуктивной биологии

08.06.2019г. Н.В. Апанасова

Зав.кафедрой генетики,

д.б.н., доцент

08.06.2019г. О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Многозародышевость, или полиэмбриония, открытая три столетия назад Левенгуком, в настоящее время считается достаточно известным явлением и обнаружена у представителей многих семейств Цветковых растений.

Зачастую исследователи проявляют к ней только научный интерес, хотя перспективность её практического использования очевидна, например, для получения гаплоидов и далее из них чистых линий, для улучшения посевных качеств семенного материала, выведения высокоурожайных сортов сельскохозяйственных растений. Однако реализация таких возможностей затруднена из-за недостаточной изученности механизмов индукции полиэмбрионии.

В литературе неоднократно указывалось о связи полиэмбрионии с апомиксисом и его элементами. Исследование особенностей возникновения многозародышевых семян у таких видов позволило бы пролить свет на причины индукции этого явления. В связи с чем, изучение проявления полиэмбрионии у партеногенетических линий кукурузы является актуальным и практически значимым. Партеногенез не является обычным для кукурузы, поэтому исследуемые формы новы и уникальны.

Цель работы:

Оценить возможность проявления полиэмбрионии у партеногенетической линии АТ-1, представленной в трёх вариантах на разных цитоплазмах.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное изучение строения зародышевых мешков и семязачатков у линии АТ-1 с разной цитоплазмой.
2. Выявить у исследуемых форм кукурузы спектр аномалий, потенциально являющихся цитоэмбриологическими предпосылками к полиэмбрионии.

3. Провести сравнительный статистический анализ частоты встречаемости выявленных цитозмбриологических предпосылок к полиэмбрионии у линии на разных цитоплазмах.
4. Изучить возможную коррелятивную связь между частотой возникновения цитозмбриологических предпосылок к полиэмбрионии и количеством зерновок с близнецовыми проростками.
5. Оценить зависимость частоты проявления полиэмбрионии от вида цитоплазмы.

Структура и объем работы. Работа изложена на 41 странице машинописного текста и включает 6 разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 28 наименований.

Основное содержание работы. Материалом для изучения послужили растения партеногенетической линии АТ-1, АТ-1 на цитоплазме ТМ (Тестер Мангельсдорфа) и АТ-1 на цитоплазме ТВ (Техасский восстановитель фертильности). Данные формы были получены в лаборатории генетики и репродуктивной биологии Саратовского государственного университета. Исходной линией послужила линия Wisconsin 23, имеющая ген *ig* и склонная к андрогенезу. В полученном потомстве были отобраны андрогенные растения, которые содержали ядро отцовского родителя (АТ-1) и цитоплазму материнского (ТМ и ТВ).

Исследуемые растения выращивались экспериментальном поле НПО "Сорго" по правилам селекционной работы (делянки 4 ряда по 15–20 растений). В период цветения для предотвращения опыления початки до появления рылец помещали под пергаментные изоляторы. Неопыленные изолированные початки фиксировали в ацеталкаголе (3 части этилового спирта, 1 часть ледяной уксусной кислоты) через 7 суток после появления рылец. Через две недели после фиксации из початков выделяли завязи и переводили их в 70% этиловый спирт для длительного хранения.

Для проведения цитоэмбриологического анализа зародышевых мешков использовали метод ферментативной мацерации, с последующей диссекцией семязачатков.

Методика приготовления препаратов зародышевых мешков включала их окраску и вычленение из семязачатков.

1. Завязи помещались в кусочки марли и промывались в проточной воде в течение 8-12 часов.
2. Материал переносили в 4% железоаммонийные квасцы на 30 минут.
3. Промывка водой 3-4 раза
4. Окрашивание ацетокармином 10-12 часов при комнатной температуре.

После окрашивания завязи промывали проточной водой в течение 2 часов, извлекали из марли и помещали в цитазу (фермент, получаемый из пищеварительного сока улиток) на 1 час. Затем цитаза удалялась пипеткой, и завязи несколько раз промывались дистиллированной водой. После мацерации завязи хранились в воде в холодильнике в течение 1-2 суток.

Из таких завязей в капле глицерина с помощью электролитически заточенных вольфрамовых игл выделяли семязачаток, а из них — зародышевый мешок. Выделенные зародышевые мешки переносили на чистое предметное стекло в каплю глицерина и накрывали покровным стеклом. Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей.

были выявлены зародышевые мешки (ЗМ) типичного строения и с аномалиями: с партеногенетическим проэмбрио, с проэмбрио и яйцеклеткой, с яйцеклеткоподобными синергидами, с дополнительными яйцеклетками (с двумя и тремя). В некоторых семязачатках были обнаружены дополнительные зародышевые мешки. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1– Количество семязачатков с типичными и аномальными зародышевыми мешками

Линии кукурузы	Количество семязачатков, содержащих, %					
	типичные ЗМ	ЗМ с проэмбрио	ЗМ с проэмбрио и яйцеклеткой	ЗМ с яйцеклетко-подобными синергидами	ЗМ с дополнительными яйцеклетками	дополнительные ЗМ
АТ -1	94,0	2,0	0,7	2,6	0,7	0,0
АТ-1 на цитоплазме ТВ	89,3	4,0	4,0	5,3	0,7	0,7
АТ-1 на цитоплазме ТМ	90,4	4,4	0,4	1,3	1,7	1,7

Зародышевые мешки типичного (нормального) строения имели яйцевидно-удлиненную формы. В расширенной части микропилярной располагается яйцевой аппарат, его клетки грушевидной формы. Яйцеклетка занимает центральное между синергидами положение. Ядро яйцеклетки обычно крупнее синергид. Ядра синергид, находятся ближе к микропилярному концу. В середине центральной клетки, под яйцевым аппаратом, находятся два рядом расположенных полярных ядра. К суженной халазальной части центральной клетки примыкает антиподальный комплекс. Число антипод может достигать 20 и более.

Причиной выявленных, аномалий в строении женского гаметофита, таких как дополнительные яйцеклетки и яйцеклеткоподобные клетки синергид, дополнительные проэмбрио, проэмбрио в присутствии яйцеклетки, как полагают некоторые авторы, являются нарушения в процессах поляризации и дифференцировки зародышевых мешков.

Наличие проэмбрио в неоплодотворенных зародышевых мешках у исследованных партеногенетических могло быть инициировало задержкой опыления.

Существует мнение, что с апомиксисом и его элементами тесно связана полиэмбриония. В ходе развития женских генеративных структур у

партеногенетических видов нередко создаются цитоэмбриологические предпосылки к полиэмбрионии. К их числу относятся выше названные аномалии в строении женского гаметофита.

Сравнительный статистический анализ выявленных отклонений в развитии женского гаметофита и семязачатков показал, как видно из таблицы 1, что в полном объёме спектр подобных аномалий обнаруживается практически у всех исследуемых в нашей работе линий.

У исходной линии кукурузы АТ-1, из выше названных аномалий большинство составили зародышевые мешки с партеногенетическими проэмбрио (2,0 %) и яйцеклеткоподобными (2,6 %) синергидами и с меньшей частотой (по 0,7 %) обнаруживались ЗМ с проэмбрио совместно с яйцеклеткой и ЗМ с дополнительными яйцеклетками. Дополнительных мегагаметофитов у данной формы не зафиксировано.

У линии АТ-1 на цитоплазме ТВ, в минимальном для этой генотипической формы количестве были представлены семязачатки дополнительными зародышевыми мешками, а также мегагаметофитом, имеющим дополнительные яйцеклетки (по 0,7 %). Максимум (от 4,0 до 5,3%) пришелся на ЗМ, соответственно с проэмбрио, проэмбрио в присутствии яйцеклетки и ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами.

Для линии АТ-1, имеющей цитоплазму Тестера Мангельсдорфа (ТМ) достоверно чаще остальных встречались семязачатки с зародышевыми мешками, имеющими к моменту фиксации завязей, партеногенетические проэмбрио (4,4 %). Между вероятностями развития семязачатков с остальными аномалиями достоверных различий не установлено. Частоты их проявления варьировали от 0,4 до 1,7 %.

При сравнении результатов анализа предпосылок к полиэмбрионии у изученных генотипических форм кукурузы, представленных на рисунке 1, можно заметить, что спектр выявленных цитоэмбриологических предпосылок идентичен, хотя отмечено небольшое варьирование по частоте

их проявления. Статистическая обработка значимых различий при этом не выявила.

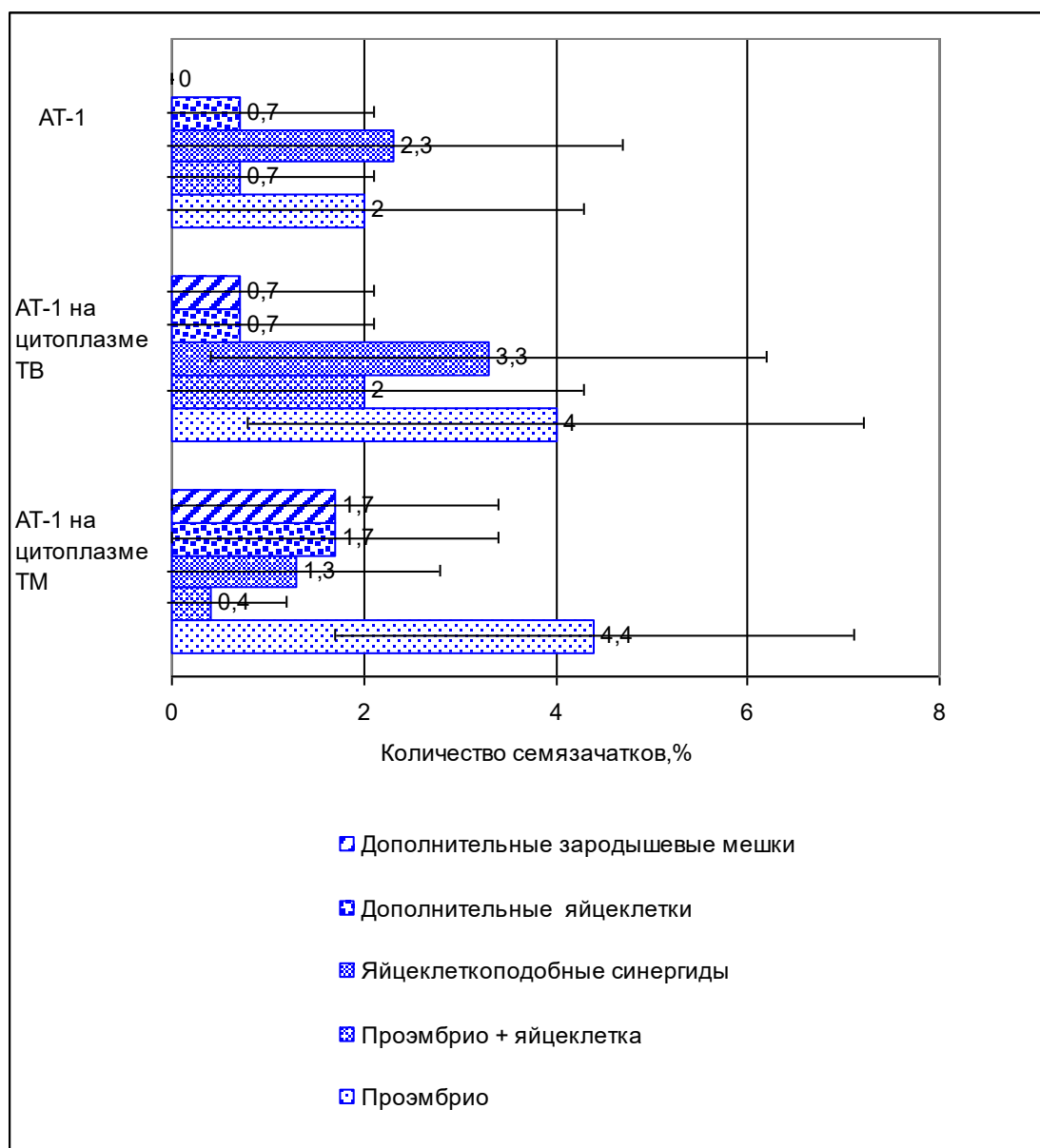


Рисунок 1 – Соотношение частот цитозембриологических предпосылок к полиэмбрионии у партеногенетических линий кукурузы.

Визуальное превосходство в этом отношении линии АТ-1 с цитоплазмой ТВ) возможно может происходить за счёт появления у неё в бóльшем количестве зародышевых мешков с яйцеклеткоподобными синергидами.

Следующий этап нашей работы заключался в применении близнецового метода – выявления полиэмбрионов среди проросших зерновок. Метод

используется с 1933 года и достаточно популярный в настоящее время.

Для анализа были использованы проросшие зерновки, выше названных генотипических форм кукурузы, полученные в два разных года (сезона).

Было установлено, что исходная партеногенетическая линия АТ-1, в данных условия оказалась более склонной к полиэмбрионии, чем её линии-аналоги на цитоплазмах Тестера Мангельсдорфа (ТМ) и тexasского восстановителя фертильности (ТВ). Как следует из рисунка 2, полиэмбрионные зерновки у линии с цитоплазмой ТВ совсем не были выявлены, а у линии на цитоплазме Тестера Мангельсдорфа (ТМ) частота их возникновения была значительно ниже, чем у самой линии АТ-1 в оба сезона. При этом можно заметить незначительное, но статистически не подтверждённое увеличение частоты встречаемости зерновок с двумя проростками во второй год эксперимента. Таким, образом можем полагать, что в данном случае, некоторую роль в преимуществе в отношении склонности к полиэмбрионии играют качественные различия в цитоплазме.

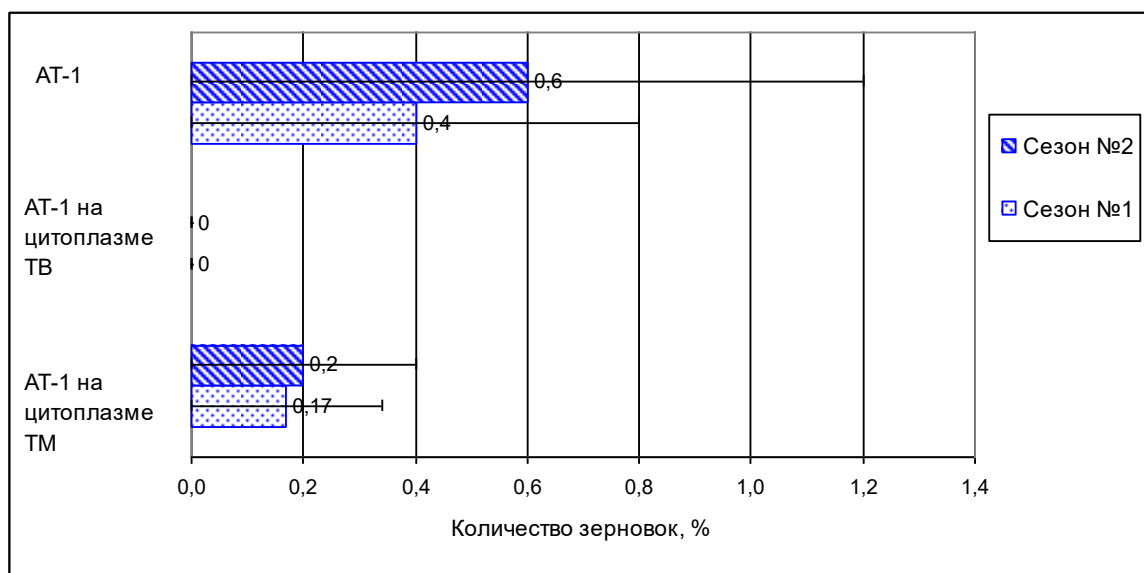


Рисунок 2 – Количество семян, с двумя проростками у трёх генотипических форм кукурузы в разные сезоны

Одновременно с анализом на близнецовость среди проросших зерновок проводился учёт выявленных гаплоидных проростков. Статистический метод,

как показано на рисунке 3, не выявил значимых закономерных различий в увеличении и уменьшении частоты гаплоидии в определённый год для всех трёх форм кукурузы, как и не выявлена корреляционная связь между количеством многозародышевых семян и числом выявленных гаплоидов.

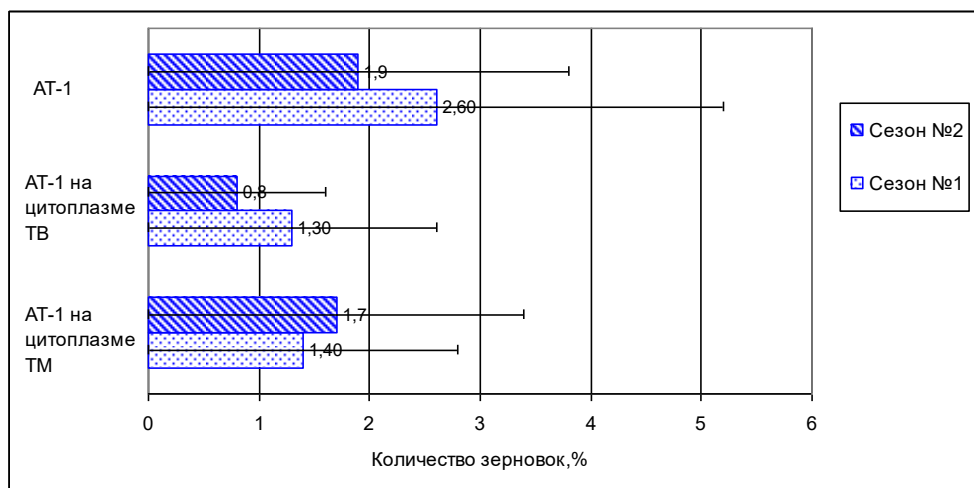


Рисунок 3 – Количество зерновок с гаплоидными проростками у трёх генотипических форм кукурузы в разные сезоны

Таким образом, сравнивая результаты анализа зародышевых мешков и проросших семян, можно констатировать, что появление цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии в семязачатках не всегда может реализоваться на уровне семян.

Выводы:

1. У всех исследуемых форм кукурузы обнаружены зародышевые мешки как нормального строения, так и весь спектр аномального строения. Только у линии АТ-1 не выявлены семязачатки с дополнительными мегагаметофитами.
2. Среди аномалий, потенциально являющихся цитоэмбриологическими предпосылками к полиэмбрионии, обнаружены: зародышевые мешки с

партеногенетическим проэмбрио, проэмбрио в присутствии яйцеклетки, дополнительными яйцеклетками, яйцеклеткоподобными синергидами, а также семязачатки с дополнительными мегагаметофитами.

3. Частота встречаемости выявленных цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии варьирует у исследуемой линии на разных цитоплазмах и статистическая значимых различий при этом не выявлено.
4. При анализе проросших семян установлено значительное преимущество линии по числу обнаруженных двоен, что не коррелирует с количеством обнаруженных предпосылок к полиэмбрионии в семязачатках.
5. По результатам данного исследования нельзя сделать однозначного вывода о зависимости частоты проявления полиэмбрионии от вида цитоплазмы.

Ушаков