

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

Кафедра генетики

**ОСОБЕННОСТИ ПЫЛЬЦЫ СКЛОННЫХ К ПАРТЕНОГЕНЕЗУ
ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

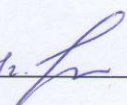
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Зубревой Юлии Васильевны

Научный руководитель:

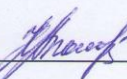
доцент, к.б.н.

10.06.21  Ю.А. Беляченко

Консультант:

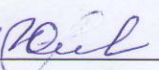
ведущий биолог лаб. биотехнологии

и репродуктивной биологии СГУ

10.06.21  Н.В. Апанасова

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, доцент

10.06.21  О.И. Юдакова

Саратов 2021

Введение

Бакалаврская работа Зубревой Ю.В. посвящена особенностям пыльцы склонных к партеногенезу линий кукурузы.

Линии кукурузы с наследуемым типом партеногенеза являются ценным материалом для решения ряда теоретических и практических задач. Количество линий кукурузы с наследуемым партеногенезом ограничено. В коллекции Саратовского университета имеются линии АТ-1 и АТ-3. В настоящее время ведутся работы по расширению коллекции линий – доноров партеногенеза. Создан ряд генетически маркированных партеногенетических аналогов линии АТ-1 – серия линий АТТМ. У этих линий хромосомы несут известные рецессивные гены, которые хорошо проявляются фенотипически, что позволяет контролировать гомозиготность этих линий. Для оптимизации отбора на партеногенез желательно выявить дополнительные диагностические признаки. Одним из таких признаков могут быть особенности строения пыльцевых зерен.

Цель работы – установить возможность диагностики партеногенеза у кукурузы, опираясь на степень дефектности пыльцы и неоднородность пыльцы по размеру.

Выпускная квалификационная работа Зубревой Юлии Васильевны состоит из 46 страниц и содержит следующие разделы:

Раздел 1 – Обзор литературы

Раздел 2 – Материалы и методы

Раздел 3 – Результаты и обсуждения

Основное содержание работы

Первый раздел выпускной квалификационной работы посвящен литературному обзору, в котором предоставлена информация о партеногенезе у растений, эволюционном и селекционном значении партеногенеза, распространении у покрытосеменных растений, классификации партеногенеза, цитоэмбриологических особенностях партеногенеза, систематическом положении, ботанической характеристики кукурузы, развитии и строении мужского гаметофита, микроспорогенезе, микрогаметогенезе, строении зрелых пыльцевых зерен кукурузы.

Партеногенез у растений

Термин «Партеногенез» был предложен Owen в 1849 г. (от греческого *parhenos* – девственница, *genus* – происхождение) – развитие зародыша без оплодотворения. Термин употребляется как по отношению к животным, так и к растениям. Одним из важных вопросов определения партеногенеза у растений является, что можно считать главным в определении этого явления – развитие без оплодотворения или развитие без оплодотворения яйцеклетки.

У растений партеногенез подразделяется на редуцированный и нередуцированный. В первом случае зародыш имеет гаплоидное число хромосом, во втором – диплоидное или полиплоидное (как результат апомейоза).

Эволюционное и селекционное значение партеногенеза

Одной из главных перспектив практического использования нередуцированного партеногенеза является закрепление гетерозиса у гибридов в силу отсутствия у апомиктов расщепления в последующих поколениях.

Пути практического использования гаплоидных растений, возникающих в результате редуцированного партеногенеза достаточно разнообразны:

1. Создание константных форм (гомозиготных линий).
2. Получение анеуплоидов и транслокаций.

3. Повышение эффективности работ по отбору, клеточной и генетической инженерии; создание мутантов и тест-объектов.
4. Преодоление несовместимости.
5. Селекция и генетический анализ комплекса признаков.
6. Ускоренное создание аллоплазматических линий.
7. Создание нередуцированных апомиктов.

Явление партеногенеза может быть использовано как в практической селекции, так и для решения целого ряда теоретических задач, таких как: геномный анализ и эволюция геномов, генетика и морфология мейоза, генетика количественных признаков и доза генов, определение функциональной диплоидизации полиплоидов, контроль гомо- и гетерозиготности, генетический груз и его элиминация, гетерозис.

Распространение у покрытосеменных растений

Диплоидный партеногенез широко распространен среди цветковых растений, и, особенно, в сем. *Poaceae* (*Brachiaria*, *Panicum*, *Poa*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Tripsacum*) с частотой встречаемости до 20% и более.

Гаплоидный партеногенез спорадически встречается у представителей разных родов цветковых: *Datura*, *Nicotiana*, *Triticum*, *Oryza*, *Hordeum*, *Brassica*, *Crepis*, *Solanum*, *Zea*, *Cossipium* и др. Частота встречаемости особей, характеризующихся наличием партеногенеза, обычно очень низка и в редких случаях превышает 1%.

Классификация партеногенеза у растений

Партеногенез – это образование зародыша из неоплодотворенной яйцеклетки с редуцированным числом хромосом в случаях редуцированного партеногенеза и с нередуцированным в случае нередуцированного.

1. Редуцированный женский партеногенез, или гиногенез, связанный с псевдогамией, - партеногенетическое образование сходной с матерью особи с материнским набором хромосом после опыления своей или чужой пылью, при отсутствии слияния женской и мужской гамет и дегенерации последней, но при наличии мейоза.

2. Редуцированный мужской партеногенез, или андрогенез, связанный с псевдогамией – партеногенетическое образование сходной с отцом особи с отцовским набором хромосом после опыления своей или чужой пылью, при отсутствии оплодотворения или дегенерации ядра яйцеклетки, но при наличии мейоза

3. Нередуцированный партеногенез, связанный с псевдогамией, т.е. зависящий от воздействия пыльцевой трубки.

4. Нередуцированный партеногенез, не связанный с псевдогамией, т.е. не зависящий от воздействия пыльцевой трубки.

Цитоэмбриологические особенности партеногенеза

Нередуцированный партеногенез у покрытосеменных растений впервые описал Juel (1898), редуцированный – Goldschmidt (1912) и Kusano (1915). В дальнейшем обе формы партеногенеза были обнаружены у нескольких сотен видов из разных семейств. Ультраструктурные исследования как гаплоидного, так и диплоидного партеногенеза весьма ограничены и касаются лишь немногих злаков. У *Helianthus annuus* изучены начальные этапы партеногенеза, индуцированного условиями культуры *in vitro*.

Систематическое положение

Род *Zea* L относится к классу однодольных *Monocotyledonae*, порядку *Poales* Nakai, семейству *Poaceae* Barnh., трибе *Andropogoneae* Dum., подтрибе *Tripsacinae* C. Presl.

Род *Zea* L. включает в себя один вид кукурузы – *Zea mays* L. ($2n=20$).

Наиболее совершенную классификацию кукурузы предложил Стартевант в 1899 году. Он обобщил результаты многолетних исследований большого сортового разнообразия (770 образцов) кукурузы США. Все сорта были разделены на семь групп в зависимости от консистенции зерна. По современной классификации, выделяют пять основных подвидов (*subspecies*) кукурузы.

Zea mays subsp. *evarta* (Sturt.) Zhuk. – лопающаяся;

Zea mays subsp. *indurata* (Sturt.) Zhuk – кремнистая;
Zea mays subsp. *amylaceae* (Sturt.) Zhuk – крахмалистая;
Zea mays subsp. *indentata* (Sturt.) Zhuk – зубовидная;
Zea mays subsp. *saccharata* (Sturt.) Zhuk – сахарная.

Ботаническая характеристика кукурузы

Кукуруза — однодольное, однолетнее травянистое растение семейства злаковых (*Gramíneae*). Ботаническое название ее *Zea mays* L.

Корень кукурузы мочковатый, хорошо развит. Стебель кукурузы цилиндрический, без полости внутри, прямое, высокое (от 0,5 до 5 м и более); Листья кукурузы линейно-ланцетные, по краю реснитчатые, с верхней стороны опушенные.

Цветки у кукурузы раздельнополые: мужские имеют только тычинки, а женские — пестики. Плод — зерновка.

Развитие и строение мужского гаметофита

Все развитие мужского гаметофита, включая образование мужских гамет, сводится лишь к двум митотическим делениям. Первое из этих делений происходит всегда под защитой оболочки микроспоры, которая превращается в новое образование — пыльцевое зерно. Второе деление совершается в одних случаях в пыльцевом зерне, а в других — лишь позднее, в пыльцевой трубке. В результате зрелые пыльцевые зерна бывают двухклеточными или трехклеточными, причем двухклеточные встречаются значительно чаще, чем трехклеточные, и известны приблизительно у 70% цветковых растений.

Микроспорогенез

В результате развития спорогенной ткани в пыльнике образуются материнские клетки пыльцы (микроспороциты). Для всех злаков характерно своеобразное однослойное расположение микроспороцитов, тетрады микроспор и пыльцевых зерен в пыльнике.

В развитии микроспоры можно выявить 3 фазы: 1) невакуолизированной микроспоры (ее ядро занимает центральное

положение), 2) вакуолизации микроспоры (ядро занимает различное положение по отношению к поре), 3) девакуолизации и усиленного роста микроспоры (ядро, как правило, расположено на стороне, противоположной поре).

Микрогаметогенез

Микрогаметогенез – это процесс образования из микроспоры мужского гаметофита (пыльцевого зерна). У покрытосеменных растений развитие мужского гаметофита сводится к одному митотическому делению. Микроспора делится митозом, в результате образуется пыльцевое зерно (пылинка).

Строение зрелых пыльцевых зерен кукурузы

Формирование пыльцевого зерна начинается с деления сильно вакуолизированной микроспоры. В результате первого дифференцирующего деления образуются генеративная (меньших размеров) и вегетативная (больших размеров) клетки. Особенность первого митоза в пыльцевом зерне злаков – одновременное образование клеточной перегородки. Электронно-микроскопическое исследование показало, что образовавшаяся стенка состоит почти целиком из каллозы, которая сохраняется очень недолго. После исчезновения каллозы генеративная клетка оказывается ограниченной 2 плазмалеммами: своей и плазмалеммой вегетативной клетки.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили растения линий склонных к партеногенезу: серия генетически маркированных линий кукурузы АТТМ, АТ-1, АТ-3.

Методы исследования

Цитогенетический метод

Цитогенетический анализ ploидности проводили на временных давленных препаратах кончиков корешков, зафиксированных в ацетоалкоголе (1:3) и окрашенных ацетокармином.

Методика приготовления препаратов пыльцы

Для приготовления препаратов пыльцы использовали следующую методику. Пыльцу, зафиксированную в ацетоалкоголе (3:1), отмывали от фиксатора, последовательно помещали ее в растворы этилового спирта с возрастающей концентрацией (70, 80 и 96%), а затем в дистиллированную воду. Перед окрашиванием проводили протравливание материала, выдерживая пыльцу в течение 20 мин в 4% растворе железоммонийных квасцов. Промывали дистиллированной водой и помещали в ацетокармин на 12-24 ч. После этого, пыльцу несколько раз промывали дистиллированной водой, меняли воду в сосуде до тех пор, пока она не оставалась неокрашенной. Пыльцу помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты. Накрывали покровным стеклом и подогревали над пламенем спиртовки. Во время нагревания происходило обесцвечивание препарата. Периодически контролировали степень просветления цитоплазмы пыльцевых зерен с помощью светового микроскопа. При нагревании уксусная кислота испарялась, поэтому ее добавляли по мере необходимости. После достижения оптимальной степени окрашивания препарата покровное стекло снимали, подняв его с одной стороны препаровальной иглой или лезвием. Удаляли уксусную кислоту фильтровальной бумагой и добавляли каплю глицерина. Тщательно перемешивали препаровальной иглой. Каплю с пыльцой накрывали чистым покровным стеклом и анализировали с помощью светового микроскопа «AxioStar Plus» (Zeiss, Германия).

Метод определения качества пыльцы

При просмотре препаратов пыльцы руководствовались следующими правилами:

1) общее число подсчитанных пыльцевых зерен на одном препарате должно составлять выборку большого объема (не менее ста);

2) во избежание ошибок при подсчете поле зрения перемещают по определенной системе: сверху вниз и слева направо.

Пыльцевые зерна измеряли при помощи микроскопа «AxioScop» (Zeiss, Германия) и разбивали на классы по размеру: нормального размера, мелкая,

крупная. Мелкой считали пыльцу, диаметр которой в полтора раза меньше обычного, крупной ту, диаметр которой в полтора раза крупнее обычного. Пыльцевые зерна также разбивали на классы по качеству: нормальные, двуклеточные, с одним спермием, плазмолизированные, со структурированной цитоплазмой, пустые. Хорошо окрашенные выполненные пыльцевые зерна считали нормальными, остальные – дефектными. Степень дефектности пыльцы (СДП) вычисляли как отношение дефектных зерен к общему числу проанализированных пыльцевых зерен, выраженное в процентах.

Результаты и обсуждения

Проводилось исследование линий АТ-1, АТ-3, АТТМ (429-432), АТТМ (433-436), АТТМ (369-372), АТТМ (325-328), Тестер Мангельсдорфа.

Предварительно линии были оценены на предрасположенность к образованию гаплоидов в полевых условиях.

Частота встречаемости гаплоидных растений у исследуемых линий кукурузы варьировала от 1,25 до 5%. Линия тестер Мангальсдорфа не склонна к проявлениям партеногенеза, гаплоидных растений у нее обнаружено не было.

Для выявления гаплоидных и близнецовых растений брали линии кукурузы, у которых были отмечены гаплоидные растений в поле: АТ-1, АТ-3; АТТМ (429-432); АТТМ (433-436); АТТМ (369-372); АТТМ (325-328).

В качестве контроля использовали линию Тестер Мангельсдорфа, не склонную к партеногенезу. Исследовали материал 2020 года. Для проращивания брали по 500 зерновок, так как согласно выводам других исследователей, партия из 500 зерновок является минимальной при выявлении полиэмбрионных и гаплоидных проростков.

При проращивании линии АТ-1 (Апомиктичная Тырнова 1) было выявлено 12 гаплоидных проростков, 2 полиэмбрионных, 36 зерновок не проросли. Оба пролиэмбрионных проростка имели пloidность $2n-2n$. У линии АТ-3 (Апомиктичная Тырнова 3) выявлено 5 гаплоидных проростков и

одна двойня ($2n-n$), 4 зерновки не проросли. При анализе серии линий АТТМ, установлено, что частота встречаемости гаплоидных проростков (без учета двоен) составляла от 2 % (линии 433-436, 325-328), до 7% у линии 429-432. Полиэмбрионные проростки у линии 433-436 не были обнаружены, что может быть связано с тем, что 63 зерновки этой линии не проросли. В других линиях их частота составила от 0,6 до 1,8%.

По результатам исследования наибольшее число гаплоидов отмечено у линии АТТМ (429-432) и составило 7,0%, частота полиэмбрионии в этой линии также была наиболее высокой и составляла 1,8%. По полевым данным также в этой линии максимальное число гаплоидных растений 4шт, что составляет 5,0%. Среди полиэмбрионов встречались как диплоид-диплоидные ($2n-2n$), диплоид-гаплоидные ($2n-n$) и гаплоид-гаплоидные ($n-n$) проростки.

Близнецовые проростки могли быть одинакового размера, либо один проросток был менее развит. В некоторых случаях один из проростков значительно уступал в размерах. Отмечены различия в толщине и длине корня. У гаплоидных проростков корень, на стадии coleoptily не превышал 3-5 см, был более тонким, и часто закручивался на конце.

Вторичный отбор проводили на стадии трех листьев. У полиэмбрионов учитывали длину главного корня, длину coleoptily, ширину первого листа. Для точного установления ploidy использовали цитогенетический метод. Цитологический анализ ploidy производили на временных давленных препаратах кончиков корешков, фиксированных в ацетоалкоголе.

Проведен анализ пыльцы партеногенетических линий кукурузы: АТ-1, АТ-3, АТТМ (429-432), АТТМ (433-436), АТТМ (369-372), АТТМ (325-328) в качестве контроля использовали линию Тестер Мангельсдорфа, не склонную к партеногенезу. Определяли качество пыльцы исследуемых линий. В каждом варианте брали пыльцу с трех растений. Проводили анализ 100 пыльцевых зерен с каждого растения.

Основная часть пыльцевых зерен имела типичное для кукурузы строение (85,99% - 93,34%) и соответствовала описаниям других авторов (Чеботарь, 1987). Пыльцевые зерна нормального строения имеют, как правило, сфероидальную, реже эллипсоидную форму, однопоровые. Содержат одну вегетативную клетку и два спермия. Спермии крупные, удлиненной формы. Ядра спермиев без ядрышек.

Вегетативная клетка содержит крупное ядро шаровидной формы. Иногда вегетативное ядро может быть измененной формы, может принимать амебовидную форму, сильно вытягивается или быть фрагментированным. Вегетативная клетка содержит одно ядрышко. При анализе пыльцы исследуемых линий отмечены двухядерные, плазмолизированные и пустые пыльцевые зерна. Кроме того, встречались полярные ядра с фрагментированным ядром и структурированной цитоплазмой.

Частота встречаемости пыльцевых зерен с плазмолизом составила от 3,33% до 5,67%. У контрольной линии Тестер Мангельсдорфа отмечено 4,0% плазмолизированных пыльцевых зерен. Пустые пыльцевые зерна у линий склонных к партеногенезу составили от 1,0 до 5,67%. У линии Тестер Мангельсдорфа количество пустых пыльцевых зерен составило 3,0%. Наличие плазмолизированных и пустых пыльцевых зерен не может быть использовано для диагностики партеногенеза у данных линий кукурузы. Эти аномалии могут быть вызваны природными факторами, такими как влажность, температура воздуха.

В результате изучения количественных характеристик пыльцы линии были оценены по размерам пыльцевых зерен. Всего просмотрено 2654 пыльцевых зерен.

Средний размер пыльцевых зерен у линии АТ-3 составил $89,7 \pm 1,1$, а коэффициент вариации 10,3. У родительских форм АТ-1 $90,2 \pm 0,67$ мкм, коэффициент вариации 4,74% и Тестер Мангельсдорфа $85,52 \pm 0,54$, коэффициент вариации 3,80%.

Средний размер пыльцевых зерен у серии линий АТТМ составил: у линии 429-432 - $84,8 \pm 1,1$ с коэффициентом вариации 8,7%; линии 433-436 - $86,5 \pm 1,2$, с коэффициентом вариации 9,4%; линии 369-372 $93,1 \pm 1,1$ с коэффициентом вариации 9,5%; линии 325-328 - $88,9 \pm 1,3$ коэффициент вариации составил 3,80%.

Все изученные линии достоверно различаются по размерам ПЗ, за исключением 325-328 и АТ-3. Размер пыльцевых зерен у серии линий АТТМ соответствует размеру пыльцевых зерен родительских форм.

Выводы

1. Линии АТ-1, АТ-3 и серия линий АТТМ характеризуются высокой частотой встречаемости гаплоидов в полевых условиях (от 1 до 7%).

2. Линии АТ-1, АТ-3 и серия линий АТТМ характеризуются высокой частотой гаплоидии и полиэмбрионии при проращивании зерновок в лабораторных условиях. Наибольшее количество гаплоидов и полиэмбрионов получено у линии АТТМ (429-432).

3. В ходе анализа выявлено, что линии АТТМ 433-436, 369-372, 325-328 имеют сходный размер пыльцевых зерен, и линии АТТМ 429-432, АТ-3 и ТМ также сходны по размеру. Линия кукурузы АТ-1 отличается более крупными пыльцевыми зернами.

4. Выявленные аномалии в микрогаметофитах (плазмолиз и пустые ПЗ) не могут быть использованы для диагностики партеногенеза у данных линий кукурузы, в связи с тем, что частоты встречаемости таких ПЗ в исследованных линиях и контроле практически не отличаются.