

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

Кафедра генетики

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПЫЛЬЦЫ И
МИКРОСПОР У ТЕТРАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ**
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
биологического факультета
Илясовой Анастасии Владимировны

Научный руководитель:

доцент каф. генетики, к.б.н.

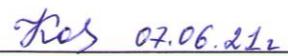
 07.06.21 Л.П. Лобанова

подпись, дата

Консультант:

с.н.с. ФГБНУ «НИИСХ

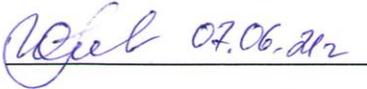
Юго-Востока», к.б.н.

 07.06.21 А.Ю. Колесова

подпись, дата

Зав.кафедрой генетики:

д.б.н., доцент

 07.06.21 О.И. Юдакова

подпись, дата

Саратов 2021

Введение. Палинология изучает пыльцу и споры растений, главным образом их оболочки. Пыльцевые зерна покрытосеменных обладают огромным разнообразием в строении спородермы и апертур. Известно, что морфологические признаки пыльцы достаточно константны в пределах одного вида, а также у различных форм или разновидностей одного вида. Поэтому характер поверхности экзины, размер и форма пыльцы, тип апертур являются важными диагностическими признаками в систематике растений.

Палинологические исследования способствуют решению разных задач экологии, палеоэкологии и палеогеографии. Споропыльцевой анализ используется в медицине, пчеловодстве, археологии, при реконструкции растительного покрова и климата, криминологии и в других направлениях. В настоящее время палинологические методы широко используются в биоиндикации, что позволяет оценивать качество среды обитания, и уровень ее суммарного загрязнения. Сведения по морфологии пыльцы культурных видов полезны также для специалистов сельского хозяйства в их работе по гибридизации и селекции.

Наиболее полные сведения по палинологии злаков содержатся в работах Л.А. Куприяновой (1948, 1975) и Федоровой (1959). Однако в литературе до настоящего времени почти ничего неизвестно об изменчивости палиноморфологических признаков у культурных злаков в зависимости от генетических факторов. Остается не изученным направление о влиянии специфических мутаций, незначительны также сведения о влиянии ploидности растений на форму ПЗ, строение спородермы и апертур. Поэтому генетическое направление в изучении морфологических признаков пыльцы является актуальным и перспективным.

Проведенный ранее на кафедре генетики СГУ анализ зрелой пыльцы автотетраплоидной кукурузы КРП-1 показал существенную гетероморфность пыльцы по размеру и форме. Однако механизм появления пыльцевых зерен

атипичной формы совершенно неясен. Актуальность данной работы заключается в выяснении причин образования пыльцы атипичной формы и получении разносторонней палинологической информации для двух тетраплоидных линий кукурузы.

Цель настоящей работы заключалась в изучении и сравнении палиноморфологических признаков у двух тетраплоидных форм кукурузы.

В задачи работы входило:

- 1) определить степень дегенерации пыльцевых зерен;
- 2) оценить вариабельность размера пыльцы у тетраплоидных растений;
- 3) описать изменчивость морфологических признаков пыльцы: формы, структуры спородермы, апертур;
- 4) описать изменчивость формы микроспороцитов в микроспорогенезе и микроспор в спорадах.

Структура и объем работы. Работа изложена на 53 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 59 наименований.

Научная новизна и значимость работы.

В работе дана сравнительная характеристика особенностей развития мужского гаметофита у двух тетраплоидных линий кукурузы. Впервые проведено сравнение морфологических изменений пыльцы в зависимости от генотипа. Получена информация об изменчивости формы пыльцевых зерен и микроспороцитов, спородермы и апертур у пыльцы тетраплоидных растений. Показана универсальность качественных изменений пыльцы разных тетраплоидных линий.

Основное содержание работы. Материалом исследования послужили микроспороциты, тетрады микроспор и зрелая пыльца, зафиксированные с тетраплоидных растений линий кукурузы КрП-1 и АТТ-1.

Анализ препаратов проводился на световом микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×40 либо 10×63. Фотографирование проводили при тех же

увеличениях на микроскопе «Axiostar-plus» (Zeise) с помощью программы визуализации «Zoombrowser», а измерение диаметра пыльцы на микроскопе Axioskop с помощью программного обеспечения «Axiovision».

При первичном анализе были выделены три основных класса пыльцевых зерен: выполненные (нормальные), плазмолизированные и пустые, т.е. полностью дегенерировавшие (таблица 1). ▶

Таблица 1 – Содержание выполненных и дегенерирующих пыльцевых зерен у тетраплоидных растений кукурузы

Линия	Год исследования/ вариант	№ растения	Число проанализированных ПЗ, шт.	ПЗ, %	
				выполненные	пустые + плазмолизированные
КрП-1	2007г.	1	1245	96,8	3,2
		2	1352	96,1	3,9
	2011г.	1	1355	96,1	3,9
		2	1550	96,4	3,6
		3	1540	96,6	3,4
	2014г.	1	1400	93,2	6,8
		2	1370	96,4	4,6
		3	1477	89,0	11,0
		4	1360	90,2	9,8
		5	1350	90,3	9,7
		6	1200	89,5	10,5
	2020г.	1	1500	91,4	8,6
		2	1350	89,1	10,9
		3	1200	93,3	6,7
4		1350	91,9	9,1	
АТТ-1	503	1	1370	93,4	6,6
		2	1500	87,0	13,0
	536	1	1500	79,2	20,8
		2	1350	93,7	6,3
	645	1	1500	86,5	13,5
		2	1400	78,4	21,6
		3	1200	87,6	12,4
		4	1500	83,6	16,4
		5	1500	85,2	14,8
		6	1500	79,8	20,2
	655	1	1430	87,6	12,4
		2	1390	86,5	13,5
3		1350	82,4	17,6	

Сравнение растений разных вариантов КрП-1 и АТТ-1 по содержанию выполненной пыльцы показало, что различия между ними незначительны. В

анализируемых вариантах обнаружены единичные растения, которые достоверно отличались от других по содержанию выполненной пыльцы (рисунок 2).

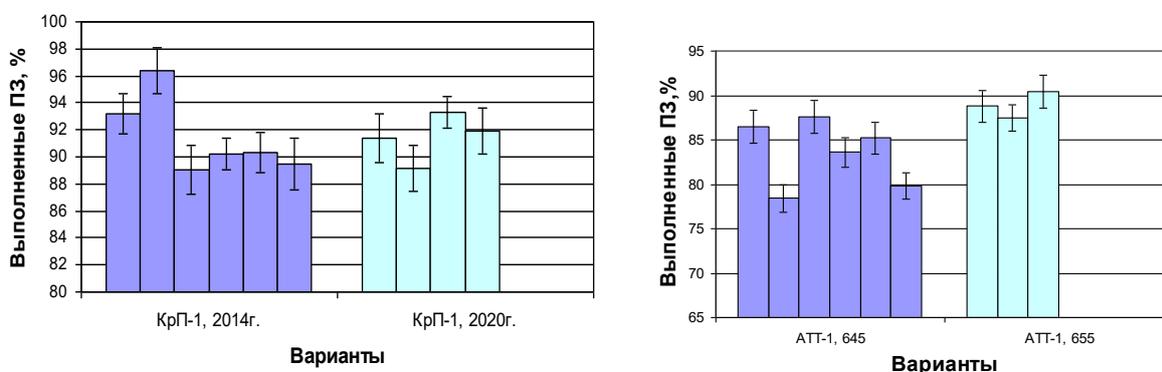


Рисунок 2 – Частота выполненных пыльцевых зерен в разных выборках растений у двух тетраплоидных линий кукурузы

У линии АТТ-1 во всех четырех исследованных вариантах количество дегенерирующей пыльцы больше и, соответственно, выполненной пыльцы меньше, чем у тетраплоида КрП-1. Исходя из средних данных за 2020, эта разница составляет 6-8 %. И хотя эта разница кажется небольшой, учитывая большой объем проанализированной пыльцы, различия между двумя тетраплоидными формами одного года вегетации (2020) достоверны (рисунок 3).

В исследованных вариантах размеры пыльцы у разных растений варьировали в различных пределах, что отражено значениями ее минимальных и максимальных размеров и значениями коэффициента вариации. Показано, что вариабельность пыльцы у всех исследованных тетраплоидных растений незначительна и коэффициент вариации не превышает 10 %. Однако диаметр ПЗ в доминирующем классе пыльцы у растений АТТ-1 на 5-10 мкм больше, чем у растений КрП-1.

Морфологическая характеристика пыльцевых зерен у тетраплоидных форм кукурузы. У исследованных тетраплоидных линий кукурузы большинство зрелых пыльцевых зерен имели шаровидную форму или

почти шаровидную форму и одну пору. Иногда наблюдалось слипание двух и более пыльцевых зерен (рисунок 4 а).

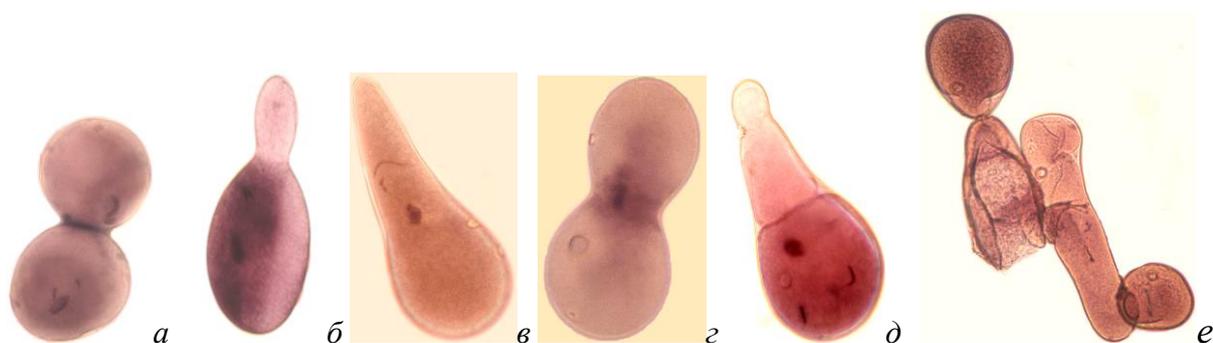
Однако при анализе у тетраплоидных растений во всех вариантах были обнаружены пыльцевых зерен атипичной формы. У разных растений КрП-1 в разные годы от 0,4 до 3,0 % выполненной пыльцы было представлено крупными пыльцевыми зернами неправильной формы. Такая же пыльца с частотой 0,1-2 % встречается и у растений АТТ-1.

Атипичные ПЗ имели разную форму: овальную, каплевидную, гантелевидную, палочковидную и другие (рисунок 4). Иногда пыльцевые зерна неправильной формы образовывали более сложные структуры (рисунок 4 е).

Часто в пыльце атипичной формы просматривается перетяжка цитоплазмы. Такая пыльца как бы состоит из двух, трех и даже четырех частей (см. рисунок 4 з, д). Возможно, это свидетельствует о блокировке образования клеточных перегородок в микроспорогенезе.

Сравнение двух тетраплоидных линий показало, что частота встречаемости пыльцы аномальной формы у КрП-1 выше, чем у АТТ-1, но при этом доверительные интервалы у двух вариантов линии АТТ-1 перекрываются с доверительными интервалами всех четырех вариантов линии КрП-1, что говорит о недостоверности различий между ними (рисунок 5). И только два варианта линии АТТ-1 (503 и 655) достоверно отличаются от всех других вариантов.

Пыльца атипичной формы значительно крупнее, чем шаровидная морфологически нормальная пыльца. В работе была промерена длина и ширина в трех вариантах. Установлено, что минимальная длина атипичных ПЗ превышала средний размер нормальной пыльцы, а максимальный размер превосходил его более чем в два раза.



a – слипшиеся пыльцевые зерна шаровидной формы; *б-д* пыльцевые зерна атипичной формы; *е* – сложные структуры пыльцевых зерен

Рисунок 4 – Пыльцевые зерна атипичной формы. Увеличение $\times 400$

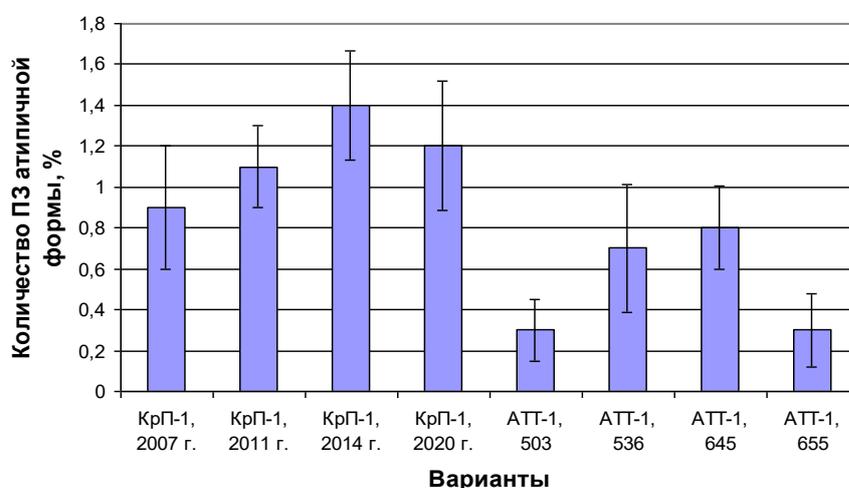


Рисунок 5 – Частота пыльцевых зерен атипичной формы в различных вариантах двух тетраплоидных линий

Структура спородермы. У пыльцевых зерен атипичной формы иногда на поверхности экзины формируются «бугорки», которые лучше всего заметны по периферии ПЗ (рисунок 6 *a*), но проступают и в центральной части (рисунок 6 *б*).

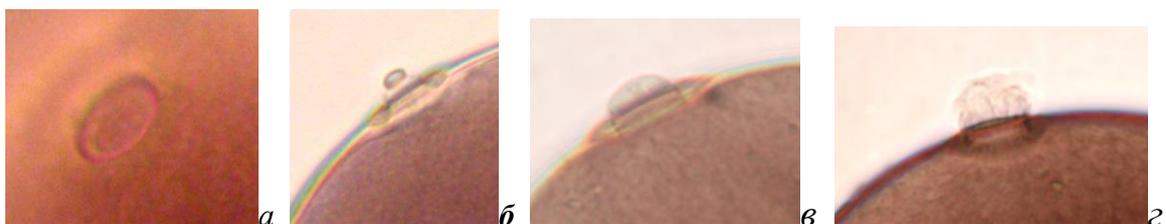
В единичных пылинках атипичной формы обнаружены своеобразные «каналы» или полости проникающие в цитоплазму от поверхности экзины (рисунок 7 *в*). Объяснить эти новообразования, которые не встречаются у нормальной шаровидной пыльцы кукурузы, пока невозможно. Необходимо привлечение других методов исследования.



a, б – новообразования на поверхности экзины в виде бугорков; *в* – «каналы», пронизывающие цитоплазму

Рисунок 6 – Особенности строения спородермы у тетраплоидной кукурузы

Апертуры у ПЗ кукурузы представлены в норме округлыми порами (рисунок 7 *a*). Пыльцевые зерна исследованных тетраплоидных линий обычно содержат единственную пору. Над порами пыльцы кукурузы часто формируется своеобразная крышечка – оперкулум (рисунок 7 *б*). Обнаружены единичные ПЗ, над порами которых формировались специфические образования. В одних случаях они напоминали «шапочку», которая, вероятно, представляет собой видоизмененный (аномальный) оперкулум (рисунок 7 *г*). В других случаях это были нитевидные образования, выходящие из поры (рисунок 7 *д*). Такие образования обнаружены только в пылинках атипичной формы. Можно предположить, что причиной послужило разрушение покровной мембраны апертуры и выделение из нее веществ интины.



a – округлые поры с ровными краями; *б, в* – поры с оперкулумом; *г* - пора с нитевидными образованиями

Рисунок 7 – Строение пор у тетраплоидных линий кукурузы

При анализе пыльцы тетраплоидных растений во всех вариантах были обнаружены пыльцевые зерна с увеличенным числом пор. Они встречались как у ПЗ шаровидной формы, так и у пыльцы с атипичной формой. Причем в последнем случае пыльца с дополнительными порами встречалась чаще.

Средние данные по частоте пыльцы с дополнительными порами в разных вариантах представлены на рисунке 8.

Число пор в многопоровых ПЗ обычно равнялось двум-трем (рисунок 9 а-в). В единичных случаях встречалась 4-5-поровая пыльца (рисунок 9 ж). Отмечено, что поры могут различаться по размеру. Располагались поры либо на разных полюсах, либо, что наблюдалось чаще, неподалеку друг от друга.

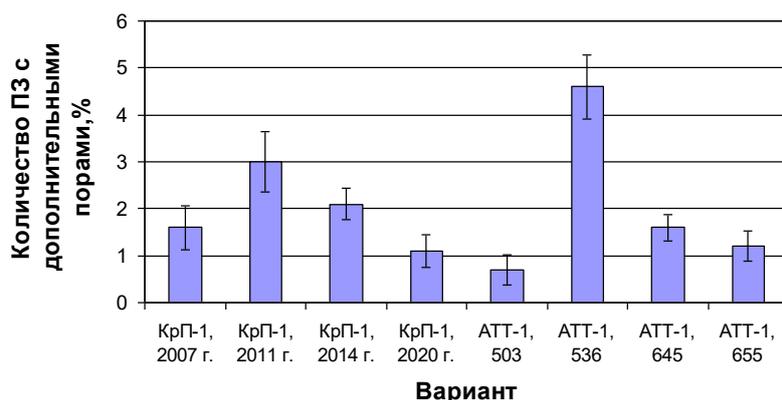
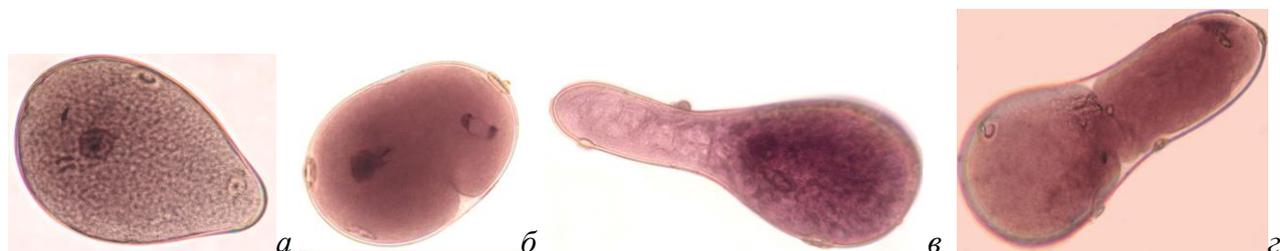


Рисунок 8 – Частота пыльцы с дополнительными порами в разных вариантах у двух тетраплоидных линий



а, б – двухпоровая; в – трехпоровая; г – четырехпоровая

Рисунок 9 – Пыльца тетраплоидной кукурузы с дополнительными порами.

Увеличение $\times 400$

Особенности микроспорогенеза у тетраплоидной кукурузы.
 Обнаружено, что микроспороциты атипичной формы встречаются во всех 4-х исследованных вариантах. Частота микроспороцитов атипичной формы, обнаруженных на разных стадиях мейоза, представлена в таблице 2. Максимальное их количество зарегистрировано на стадиях первого мейотического деления, среди которых доминировали микроспороциты находящиеся на стадии профазы. Минимальное количество аномальных

микроспороцитов обнаружено на стадии диады клеток.

Общее количество микроспороцитов атипичной формы в мейозе разных вариантов составляет от 1,3 до 10,8 % (рисунок 10). Микроспороциты атипичной формы на всех стадиях мейотического цикла, начиная с профазы-I были представлены более крупными и удлинненными клетками (рисунок 11 б, в, д, е). Ядро всегда располагалось в расширенной части клетки.

Таблица 2 – Частота микроспороцитов аномальной формы у тетраплоидных линий на разных стадиях мейоза

Вариант	Число проанализированных микроспороцитов, шт	Микроспороциты атипичной формы на стадиях мейоза, %		
		I мейоз	диады	II мейоз
КрП-1, 2020	867	7,8	0,5	2,5
АТТ-1, 503	119	0,8	0,3	0,2
АТТ-1, 645	811	3,0	0,5	1,3
АТТ-1, 655	333	1,5	0,7	0,4

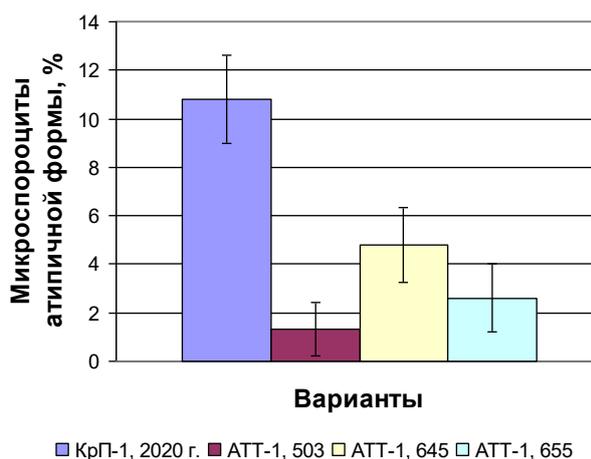
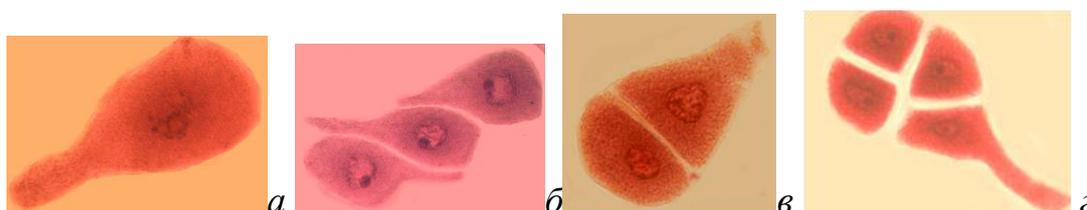


Рисунок 10 – Соотношение микроспороцитов аномальной формы в четырех вариантах тетраплоидной кукурузы



а, б – профаза I, микроспороциты аномальной формы; в – диада, с одной клеткой аномальной формы; г – тетрада с микроспорой аномальной формы
Рисунок 11 – Микроспороциты и микроспоры нормальной и атипичной формы

В ходе проведенного анализа обнаружены тетрады микроспор нетипичной формы и споры с числом клеток, отличным от четырех: триады, пентады и гексады микроспор. Их наличие свидетельствуют о различных нарушениях карио- и цитокинеза в мейозе у тетраплоидной кукурузы.

Образование спор с числом клеток отличным от четырех встречается с частотой 0,8 % у линии КрП-1 и 2, 5 % у линии АТТ-1. Чаще всего встречались пентады, реже триады и как единичные структуры – гексады. Споры, состоящие из 3, 5 или 6 дочерних клеток содержали клетки равноценные или неравноценные по размеру.

На стадии сформировавшихся тетрад у обеих линий обнаружены тетрады, у которых одна из клеток имела атипично удлиненную форму (рисунок 11в).. Частота тетрад, содержащих микроспоры атипичной формы, составила 2,3 % у КрП-1 и 1,8 % у АТТ-1. Аномально удлиненные микроспоры были обнаружены также в триадах и пентадах.

Заключение. Проведенное исследование палиноморфологических признаков у двух тетраплоидных линий кукурузы обнаружило умеренную дегенерацию зрелых пыльцевых зерен. Высокий процент выполненной пыльцы типичной формы и морфологического строения указывает на достаточно высокую мужскую фертильность изученных линий.

У тетраплоидных растений обеих линий обнаружены такие специфические аномалии, как появление пыльцевых зерен атипичной формы, с дополнительными порами, измененной спородермой. Подобные отклонения могут быть обусловлены влиянием дополнительного генетического материала и геномным дисбалансом. Однако появление в мейозе микроспороцитов атипичной формы может свидетельствовать об иных, возможно, наследственных причинах появления пыльцы аномальной формы. Не исключено, что исследованные тетраплоидные линии являются уникальным материалом для исследования онтогенеза пыльцы. Полученные данные по морфологии пыльцы важнейшего культурного злака – кукурузы, могут быть полезны также для специалистов сельского хозяйства в работах по гибридизации и селекции.

Выводы:

1. Пыльца тетраплоидных растений характеризуется низкой или умеренной степенью дегенерации, которая варьирует у разных растений от 3,2 до 21,6 %. Показано, что в вариантах партеногенетической тетраплоидной линии АТТ-1 дегенерация пыльцы в среднем выше на 6-8 %, чем у линии КРП-1.
2. Изменчивость растений по размеру пыльцевых зерен у разных тетраплоидных линий небольшая, что свидетельствует о достаточно высокой стабильности этого признака. Пыльца линии КрП-1 более мелкая, но характеризуется большим размахом изменчивости диаметра ПЗ (от 65,7 до 148,1 мкм).
3. Пыльцевые зерна атипичной формы зарегистрированы у всех тетраплоидных растений с частотой 0,1-3 %. Они отличались от нормальных ПЗ шаровидной формы внешним видом, размером, числом и строением пор. Их образование может быть обусловлено нарушениями в микроспорогенезе и тетрадогенезе.
4. У пыльцевых зерен атипичной формы обнаружено изменение структуры спородермы. На поверхности экзины возможно образование специфических «бугорков», а над порами регистрировались аномальные оперкулы или нитевидные образования.
5. Во всех вариантах были обнаружены пыльцевые зерна с увеличенным числом пор, которые чаще встречались у пыльцы с атипичной формой. Максимальное количество пыльцы с дополнительными порами наблюдалось у линии АТТ-1 в 536 варианте и составило в среднем 4,6 %.
6. В микроспорогенезе, начиная со стадии профазы I, зарегистрировано образование микроспороцитов аномальной формы, а на стадии тетрад образование микроспор атипичной формы. Их образование обусловлено нарушениями ядерных делений и цитокинеза в микроспорогенезе.



