МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

ЯВЛЕНИЕ ПОЛИЭМБРИОНИИ У ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ НА РАЗНЫХ **ЦИТОПЛАЗМАХ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 2 курса 241 группы Направления подготовки магистрауры 06.03.01 Биология Биологического факультета Ушаковой Анны Александровны

TT			
Ha	VUHLIU	DVKORO	дитель:

доцент, канд. биол. наук Улямий — 18.05 гг Т.А. Алаторцева

Научный консультант:

ведущий биолог лаборатории

биотехнологии

и репродуктивной биологии

SSA 1206 28.05.21 Н.В. Апанасова

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

Mul 28.0521 О.И. Юдакова

Саратов 2021

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 AT-1, представленной в четырёх вариантах на разных цитоплазмах.

Задачи исследования:

- 1. Провести сравнительное изучение строения зародышевых мешков и семязачатков у линии AT-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 цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии у линии на разных цитоплазмах.
- 4. Выявить генотипическую форму кукурузы с более стабильным проявлением склонности к полиэмбрионии.
- 5. Изучить возможную коррелятивную связь между частотой возникновения цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии и количеством зерновок с близнецовыми проростками.
- 6. Оценить зависимость частоты проявления полиэмбрионии от вида цитоплазмы.

Структура и объем работы. Работа изложена на 65 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 36 наименований.

Основное содержание работы. Материалом для изучения послужили растения партеногенетической линии AT-1, AT-1 на цитоплазме ТМ (Тестер Мангельсдорфа) и AT-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 ід и склонная к андрогенезу. В полученном потомстве были отобраны андрогенные растения, которые содержали ядро отцовского родителя (AT-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 поточной 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 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.

Так же в работу входило проращивание семян и выявление гаплоидных растений, а так же наличие близнецовости. Для этого семяна проращивались в специальных стерильных условиях, дабы исключить наличие патогенных грибов. Через три дня после появление основного корешка брался материал

апикальной части, окрашивался и готовился давленный препарат. Во время метафазы можно было подсчитать точное количество хромосом.

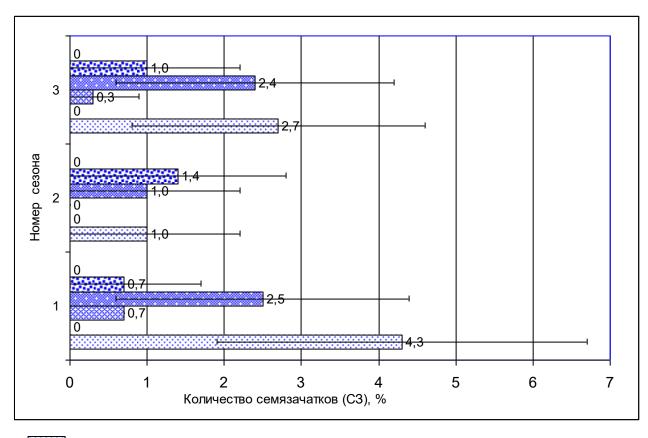
Были выявлены зародышевые мешки (3M) типичного строения и с аномалиями: с партеногенетическим проэмбрио,

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	Номер	Количество семязачатков, содержащих, %						
кукурузы	сезона	ЗМ типичного	3М с дополнитель-	3М с яйцеклетко-	3М с одним проэмбрио	ЗМ с двумя	ЗМ с проэмбрио и	два ЗМ
		строения	ными яйцеклетками	подобными синергидами		проэмбрио	яйцеклеткой	
AT-1	1	92,4	0,7	2,5	4,3	0	0	0
	2	96,5	1,4	1	1	0	0	0
	3	93,5	1	2,4	2,7	0	0,3	0
AT-1 (TM)	1	90,5	1,7	1,4	4,4	0	0,3	1,7
	2	95,3	0	1,7	1,3	0	0,3	1,3
	3	92,9	2	2	2	1	0	0
AT-1 (TB)	1	89,5	0	4,1	3,7	0	2	0,7
	2	88,9	2,8	1,4	4,2	0,7	1,4	0,7
	3	90,7	2,1	3,8	2,4	0,7	0	0,3
АТ-1 (ГПЛ- 52)	1	92	0	2	0	0	0	0
	2	91	1	3	4	0,5	0	0,5
	3	93	0	4,5	2	0	0	0



ЗМ с проэмбрио

3M с двумя проэмбрио

ЗМ с проэмбрио и яйцеклеткой

ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами

3M с дополнительными яйцеклетками

Семязачатки с дополнительными ЗМ

Рисунок 1 — Частота встречаемости семязачатков с аномальными и дополнительными зародышевыми мешками (3M) у линии кукурузы AT-1 в течение трёх сезонов

Для линии АТ-1, имеющей цитоплазму Тестера Мангельсдорфа (ТМ), в течение трёх сезонов варьирование по частоте проявления аномалий в строении мегегаметофита также имело место. Так, для семязачатков с зародышевыми мешками, имеющими к моменту фиксации завязей партеногенетические проэмбрио варьирование было от 1,3 до 4,4%,

проэмбрио совместно с яйцеклеткой — от 0 до 0,3%, яйцеклеткоподобные синергиды — от 1,7 до 2,0%, дополнительные яйцеклетки — от 0 до 2,0%, с дополнительными 3M — от 0 до 1,7%. Кроме того, в семязачатках третьего сезона было зафиксированы случаи появления 3M с двумя проэмбрио с частотой 1,0%.

Между вероятностями развития семязачатков с аномалиями разного типа достоверных различий не установлено. Исключением являлись ЗМ с одновременным присутствием проэмбрио и яйцеклетки, которые на протяжении исследованных сезонов встречались с крайне низкой частотой (0 -0,3%).

У линии AT-1 на цитоплазме TB, как изображено на рисунке 6, в минимальном для этой генотипической формы количестве были представлены семязачатки дополнительными зародышевыми мешками (0,3-0,7%) и двумя проэмбрио (0-0,7%).

В остальных случаях варьирование было наглядным и составляло у зародышевых мешков с партеногенетическим проэмбрио от 2,4-4,2%, с проэмбрио и яйцеклеткой – от 1,4 до 3,8%, дополнительной яйцеклеткой – от 0 до 2,8%, яйцеклеткоподобными синергидами – от 1,4 до 4,1%.

При анализе зародышевых мешков линии AT-1 на цитоплазме ГПЛ-52, наиболее вероятными предпосылками к полиэмбрионии следует считать появление в женском гаметофите яйцеклеткоподобных синергид с частотой от 2,0 до 4,4% (в зависимости от сезона), Только при анализе семязачатков второго сезона исследования были обнаружены с низкой частотой зародышевые мешки с двумя проэмбрио (0,3%), с дополнительной яйцеклеткой (1,0%) и двумя 3M (0,3%).

Для выявления линий кукурузы с устойчивой склонностью к полиэмбрионии было проведение сравнение суммарных частот её цитоэмбриологических предпосылок по сезонам. Установлено, что для линий AT-1 и AT-1 на цитоплазме TM, достоверно более благоприятными были

сезоны №1 и №3, когда частота возникновения предпосылок составляла, соответственно, 3.6 - 3.7% и 5.0 - 5.1%.

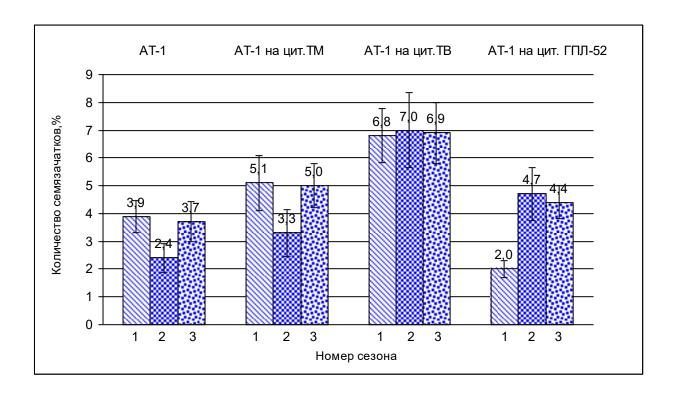


Рисунок 2 — Соотношение суммарных частот возникновения цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии у разных линий кукурузы в течение трёх сезонов

У линии АТ-1 на цитоплазме ТВ в разной степени благоприятными были все три сезона, и частота возникновения предпосылок составляла 6,8-7,0%. Для линии АТ-1 на цитоплазме ГПЛ-52 самая минимальная частота проявления этого признака пришлась на сезон №1 (2,0%). Достоверно более высокие частоты были отмечены в сезонах №2 и №3, соответственно, 4,7 % и 4,4%. Следовательно, можно заключить, что из всех четырёх исследованных форм кукурузы наибольшая частота возникновения цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии по результатам трёх лет эксперимента характерна для линии АТ-1 на цитоплазме ТВ. Поэтому мы склонны предполагать, что для этой генотипической формы может быть характерна

стабильная тенденция к полиэмбрионии. Средняя, исходя из трёх сезонов, частота возникновения предпосылок к полиэмбрионии достоверно выше у линии AT-1 на цитоплазме TB (6,9%), по сравнению с тремя другими линиями: AT-1 (3,3%), AT-1 на цитоплазме TM (4,5%) и AT-1 на цитоплазме $\Gamma\Pi \Pi$ -52 (3,7%).

Следующий этап нашей работы заключался в применении близнецового метода — выявления полиэмбрионов среди проросших зерновок. Метод используется с 1933 года и достаточно популярен в настоящее время.

Для анализа были использованы проросшие зерновки, выше названных генотипических форм кукурузы, полученные в три разных года (сезона). Изображение близнецовых проростков и процесса митоза в клетках корневой меристемы редставлены на рисунке 3.

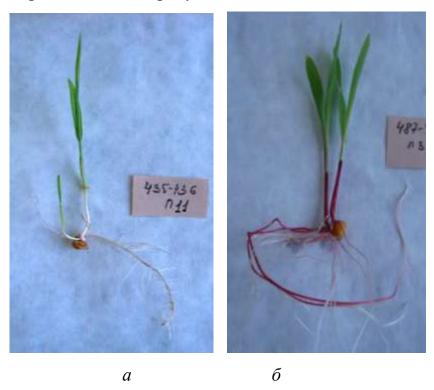


Рисунок 3 — Близнецовые проростки: a — с плоидностью n (слева) и 2n (справа), δ — с плоидностью 2n и 2n

У линии с цитоплазмой ТВ полиэмбрионы совсем не были выявлены в сезонах №1 и №3. У линии АТ-1 частота их возникновения составляла от 0,4 до 0,6%, у линии АТ-1 на цитоплазме Тестера Мангельсдорфа (ТМ) — от 0,2 до 0,4%. Достоверно максимальное значение этого признака (1,2 и 1,8%)

было зафиксировано в сезоны № 1 и №3 у линии АТ-1 на цитоплазме ГПЛ-52.

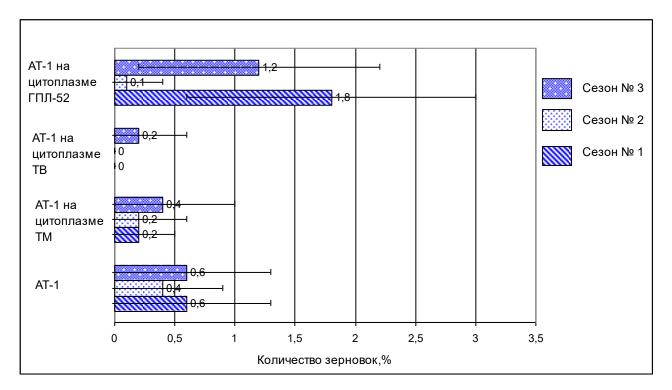


Рисунок 4 — Количество семян, с двумя проростками у четырёх генотипических форм кукурузы в разные сезоны

Таким образом, исходная партеногенетическая линия AT-1, в данных условиях оказалась менее склонной к полиэмбрионии, чем её линия- аналог на цитоплазме ГПЛ-52.

Одновременно с анализом на близнецовость среди проросших зерновок проводился учёт выявленных гаплоидных проростков, изображение которых представлено на рисунке 5.



Рисунок 5 – Гаплоидный проросток кукурузы

Подсчёт семян с гаплоидами показал, что частота проявления гаплоидии у исследуемых линий несколько колеблется в зависимости от сезона в следующих пределах: у линии AT-1 — от 1,9 до 2,6%, линии AT-1 на цитоплазме TM — от 1,0 до 1,7%, линии AT-1 на цитоплазме TB от 0,8 до 1,3%, линии AT-1 на цитоплазме TD — от 1,0 до 1,8%.

Статистический метод анализа полученных данных для всех четырёх форм кукурузы, не выявил значимых закономерных различий в варьировании частоты гаплоидии в исследуемые годы, как и не выявлена корреляционная связь между количеством многозародышевых семян и числом выявленных гаплоидов. Таким образом, в данном случае нельзя также говорить о влиянии типа цитоплазмы на частоту проявления полиэмбрионии у изученных линий.

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.

Таким образом, подводя итог проведённому исследованию и принимая во внимание данные из литературных источников следует сделать заключение, что склонность к полиэмбрионии, свойственная чаще всего апомиктам, наследуется при гибридизации с амфимиктичными формами.

Гибриды, стабильно проявляющие признак многозародышевости, могут быть надёжными объектами для познания механизмов индукции этого

явления, что позволит в дальнейшем практически использовать его не только в связи с апомиксисом, но и самостоятельно: для повышения пищевых качеств семян за счёт увеличения размеров зародышевой части семян, для улучшения их посевных качеств, для экспериментальной индукции, сохранения и доращивания генетически уникальных близнецовых зародышей в культуре *in vitro*.

Исследование причин и механизмов возникновения многозародышевости важно и в теоретическом плане, так как расширяет знания о характере протекания этих жизненно важных процессов онтогенеза

Выводы:

- 1. У всех исследуемых форм кукурузы обнаружены зародышевые мешки как нормального строения, так и весь спектр аномального строения. Только у линии AT-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.

явления, что позволит в дальнейшем практически использовать его не только в связи с апомиксисом, но и самостоятельно: для повышения пищевых качеств семян за счёт увеличения размеров зародышевой части семян, для улучшения их посевных качеств, для экспериментальной индукции, сохранения и доращивания генетически уникальных близнецовых зародышей в культуре *in vitro*.

Исследование причин и механизмов возникновения многозародышевости важно и в теоретическом плане, так как расширяет знания о характере протекания этих жизненно важных процессов онтогенеза

Выводы:

- 1. У всех исследуемых форм кукурузы обнаружены зародышевые мешки как нормального строения, так и весь спектр аномального строения. Только у линии AT-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.

Twat