

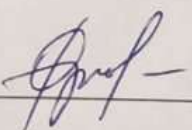
МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

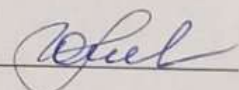
**ХАРАКТЕРИСТИКА ПЫЛЬЦЫ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ
ГАПЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Автореферат бакалаврской работы
Студентки 4 курса 422 группы
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Коптиловой Анны Андреевны

Научный руководитель:
старший преподаватель

24.06.24.  О. В. Гуторова

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

24.06.24  О. И. Юдакова

Саратов 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В настоящее время экспериментально доказано, что разработка новых и эффективных методов селекции растений связана с управлением репродуктивной системой, которая в конечном итоге реализует отбор и формирование новых признаков, в том числе желательных для человека.

Линии гаплоидного происхождения широко используются для создания высокогетерозисных гибридов кукурузы. В связи с тем, что такие линии получают путем удвоения гаплоидов, особенностью их является почти 100 % гомозиготность по аллелям всех генов. При скрещивании их между собой наблюдается высокий эффект гетерозиса у потомства. Вовлечение новых линий кукурузы в селекционный процесс для получения ценных коммерческих гибридов требует оценки репродуктивного потенциала родительской формы. Для этих целей используются различные методы оценки пыльцы кукурузы, основанные на анализе пыльцевых зерен. Несмотря на то, что морфологические особенности пыльцы достаточно постоянны в пределах одного вида, использование метода оценки пыльцы позволяет решать широкий спектр селекционных задач: диагностика апомиксиса, выявления полиплоидных форм, реакция вида на изменение условия возделывания, характеристика репродуктивной биологии развития, соблюдение пространственной изоляции посевов при размещении семноводческих посевов, установление сложной гибридной природы, отбор на контрастных температурах.

Актуальность данной работы заключается в изучении мужского гаметофита линий кукурузы гаплоидного происхождения. Чтобы создавать высокоурожайные гибриды, нужно использовать чистые линии, а создание гомозиготных линий происходит различными способами.

Цель данной работы: пыльцевой анализ линий кукурузы гаплоидного происхождения с целью последующей селекции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) собрать и зафиксировать пыльцу линий кукурузы гаплоидного происхождения: ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 9, ГЛ 10, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 1 (23), ГЛ 2 (23), ГЛ 3 (23), ГЛ 4 (23), ГЛ 5 (23), ГЛ 6 (23) и контроля: ГПЛ-1 и ТМ;

2) изучить морфологию пыльцевых зерен линий гаплоидного происхождения и контроля на временных ацетокарминовых препаратах;

3) определить степень изменчивости размеров выполненных пыльцевых зерен;

4) оценить линии и рекомендовать, какие перспективны для дальнейшей селекции.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка использованных источников, приложения А и содержит 9 рисунков и 2 таблицы. Общий объем работы составляет 50 страниц. Количество использованных литературных источников составило 46 шт., из них 10 шт. на иностранном языке.

Научная новизна и значимость работы. Получены данные о линиях кукурузы, некоторые линии рекомендованы для дальнейших селекционных работ по созданию высокогетерозисных гибридов.

Публикации. По теме выпускной квалификационной работы опубликовано 2 работы, которые были представлены на международной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» в 2024 г. (г. Саратов) и на V научно-исследовательской конференции, посвященной 85-летию А. И. Заварзина.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Явление гаплоидии, терминология и классификация гаплоидии

В этой главе была рассмотрена терминология гаплоидии, приведены классификации гаплоидов разных ученых, рассмотрены методы получения гомозиготных линий на основе гаплоидов.

2 Морфологические особенности кукурузы

В главе представлено морфологическое описание кукурузы, а также особенности мужской репродуктивной сферы. Рассмотрено строение и развитие зрелых пыльцевых зерен кукурузы.

3 Материал и методы исследования

Материалом исследования была зрелая пыльца линий кукурузы гаплоидного происхождения: ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 9, ГЛ 10, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 1 (23), ГЛ 2 (23), ГЛ 3 (23), ГЛ 4 (23), ГЛ 5 (23), ГЛ 6 (23). Контролем служила пыльца линий кукурузы ГПЛ-1 и ТМ. ГПЛ-1 является также линией гаплоидного происхождения, ТМ (Тестер Мангельсдорфа) используется как модельная линия. Обе эти линии характеризуются нормальной пыльцой.

В работе представлены результаты анализа пыльцы, собранной в период открытого цветения и зафиксированной в ацетоалкоголе в 2023 году.

Данная работа проводилась на кафедре генетики Саратовского государственного университета в течение 2023–2024 гг., а также на экспериментальных полях ФГБНУ РосНИИСК «Россорго».

Пыльцевой анализ – это метод исследования, позволяющий определять репродуктивный потенциал растений по характерным морфологическим особенностям пыльцевых зёрен. Все эти характеристики очень важны при проведении селекционных работ с целью получения продуктивного потомства. Вовлечение в селекционный процесс новых линий кукурузы для получения ценных коммерческих гибридов требует оценки репродуктивного потенциала родительских форм. Для этих целей используют метод пыльцевой оценки, основанный на анализе пыльцевых зерен. Пыльцевые

зерна являются частью растения, поэтому изменение их базовых характеристик могут сказаться на фертильности и репродуктивной биологии растения. Различные морфологические характеристики, такие как поверхность пыльцевого зерна, диаметр, размер – на все это влияет множество факторов. Таким образом, аномальные пыльцевые зерна могут влиять на фертильность, тем самым снижая репродуктивный потенциал культуры.

В ходе эксперимента были использованы методики выращивания кукурузы, ее изоляции, методика изготовления изоляторов.

Метод искусственного опыления включает изоляцию женских соцветий путем надевания на початки пакетов из пергаментной бумаги – изоляторов. При самоопылении растения пыльцу собирают с метелки и помещают на рыльца того же растения. Для получения гибридов берут пыльцу с растения одного сорта и помещают на пестики другого сорта. На изоляторе указывают дату изоляции и дату проведенного опыления. Для приготовления изоляторов используется пергаментная бумага, которая складывается и сшивается в виде пакета.

Свежесобранную пыльцу фиксировали в уксуснокислом спирте (3:1). Анализ зрелой пыльцы проводился по растениям. В разных вариантах использовалась пыльца с 1–3 растений.

Анализ строения пыльцевых зерен проводился на временных препаратах, методика приготовления которых включала несколько этапов:

- 1) пыльцу, зафиксированную в уксуснокислом спирте (3:1), отмывают от фиксатора, последовательно помещая ее сначала в растворы этилового спирта с возрастающей концентрацией (70, 80 и 96%), а затем в дистиллированную воду;
- 2) промывают пыльцу дистиллированной водой и помещают ее в ацетокармин на предметное стекло;
- 3) в каплю с ацетокармином добавляют каплю глицерина, тщательно перемешивают пыльцу препаровальной иглой, чтобы не повредить пыльцу,

иглу следует держать вертикально и не отрывать ее от поверхности предметного стекла. Затем накрывают чистым покровным стеклом и анализируют с помощью светового микроскопа.

Анализ морфологии ПЗ был проведен у восемнадцати дигампоидных и двух контрольных линий кукурузы. У исследуемых линий изучали от 200 до 600 штук пыльцевых зерен. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Zeiss «Primo Star» при увеличении 10×10 или 10×40 .

У исследуемых линии была проанализирована пыльца с трех растений по 200 штук пыльцевых зерен с каждого. По морфологии все ПЗ были разделены на семь групп: 1) выполненные хорошо окрашенные ПЗ; 2) ПЗ с признаками плазмолиза; 3) ПЗ маленькие с плазмолизом; 4) пустые ПЗ; 5) нетипичной формы; 6) ПЗ с дополнительной структурой; 7) ПЗ окрашенные ярко.

Пыльца, способная произвести оплодотворение, называется фертильной. К «условно фертильным» были отнесены выполненные и хорошо окрашенные ПЗ. Пыльца остальных групп считалась дефектной и стерильной. Фертильные зрелые трехклеточные пыльцевые зерна характеризуются красной зернистой цитоплазмой.

Фертильные пыльцевые зерна полностью заполнены крахмалом, тогда как стерильные пыльцевые зерна содержат следы крахмала или не имеют его совсем.

Размеры ПЗ в количестве 100 штук каждого варианта измеряли на микроскопе Zeiss «Axioscop» с помощью программы «AxioVision»; все расчеты проводили с помощью программы «Microsoft Excel». Измерение диаметра проводили только на выполненных, хорошо окрашенных ПЗ, диаметр дегенерирующих и пустых пыльцевых зерен не измерялся.

Статистическую обработку проводили в соответствии с общепринятыми методами с использованием программы Microsoft Excel 2016.

4 Результаты и их обсуждение

Известно, что качество пыльцы тесно связано с плодовитостью растений. Дегенерирующие пыльцевые зерна являются стерильными и характеризуются различной степенью плазмолиза, который легко определяется визуально (рисунок 1).

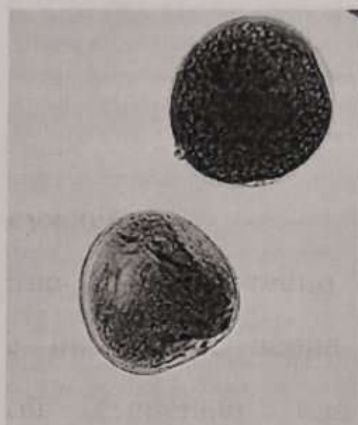


Рисунок 1 – ПЗ с различной степенью плазмолиза (линия ГЛ 4(23));
увеличение 10×40

При определении степени дефектности пыльцы у дигаметоидных линий кукурузы были выделены два основных класса пыльцевых зерен: выполненные (нормальные) и дегенерирующие.

Наиболее часто во всех вариантах встречались следующие аномалии: плазмолизированные и пустые пыльцевые зерна (рисунок 2).

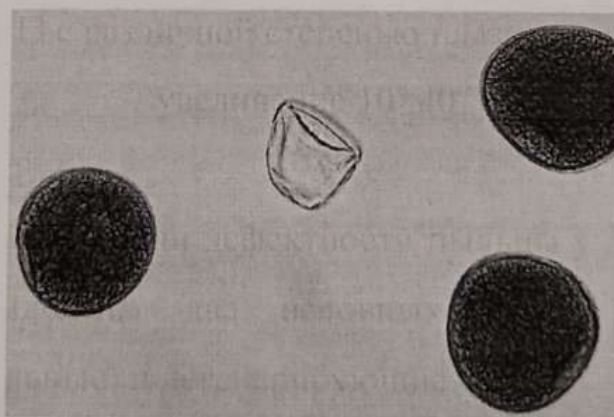
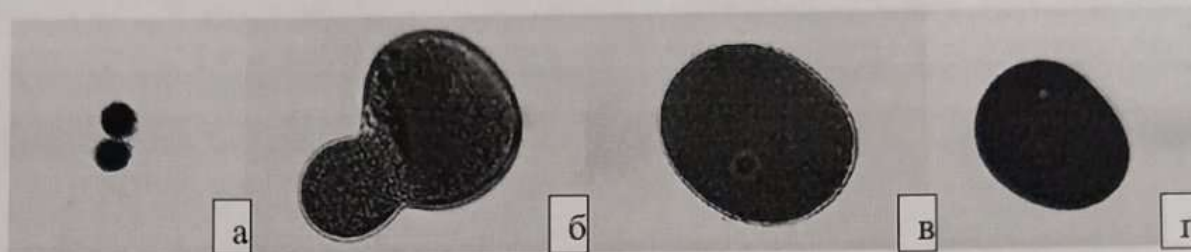


Рисунок 2 – Морфологическая неоднородность пыльцы у линии гаплоидного происхождения ГЛ 3(23); увеличение 10×40

Также были выявлены следующие типы аномалий (рисунок 3): маленькие с плазмолизом ПЗ (рисунок 3 а), нетипичной формы (рисунок 3 б), ПЗ с дополнительной структурой (рисунок 3 в) и ПЗ с ярко окрашенной цитоплазмой (рисунок 3 г).



а – маленькие с плазмолизом (ГЛ 2(23)); б – нетипичной формы (ГЛ 1(23)); в – с дополнительной структурой (ГЛ 10); г – окрашенные ярко (ГЛ 2(22))

Рисунок 3 – Пыльцевые зерна с различными отклонениями; увеличение 10×40

В результате анализа выяснилось, что основная часть (75,3 %) пыльцевых зерен во всех вариантах, включая контроль, имела типичное для кукурузы строение. Пыльцевые зерна нормального строения, как правило, имеют округлую форму, однопоровые, содержат одну вегетативную клетку и два спермия. Вегетативная клетка имеет одно округлое ядро. Спермии крупные, удлиненной формы. Наряду с нормальными, во всех вариантах встречались дефектные пыльцевые зерна с высокой частотой (11-44 %).

Плазмолизованные ПЗ встречались среди всех линий гаплоидного происхождения с частотой от 9,33 % до 28,17 %; пустые – с частотой от 0,5 % до 11,83 %. Был обнаружен тип аномалии только в линиях гаплоидного происхождения – маленькие ПЗ с плазмолизом, которые встречались с частотой от 0,17 % до 3,83 %. Также присутствовали ПЗ нетипичной формы с выростами (0,17-2,17 %), с дополнительной структурой (0,17-0,25 %) и ярко окрашенные (0,25-0,33 %).

В контрольных вариантах были обнаружены только плазмолизированные ПЗ с частотой (5,33-19 %) и пустые (5-5,5 %), но у линии ГПЛ-1 были выявлены также ПЗ нетипичной формы с частотой 0,17 %.

Количество дефектной пыльцы у всех линий, включая контроль, превышало допустимое значение в 11 %. Согласно проведенным ранее исследованиям, у контрольных линий ГПЛ-1 и ТМ в течение несколько лет наблюдались частоты дефектной пыльцы, которые не превышали 10 %.

Результаты показали, что присутствует большое количество дефектных ПЗ, вероятно, это связано с неблагоприятными условиями возделывания кукурузы в 2023 году (сухое и жаркое лето).

При анализе пыльцы у линий гаплоидного происхождения кукурузы важным критерием является размер пыльцы.

Измерение диаметра проводили только у выполненных пыльцевых зерен, которые имели округлую форму и хорошо окрашенную цитоплазму. Измерению подвергались все, без исключения, выполненные пыльцевые зерна, находящиеся в поле зрения микроскопа (рисунок 4). Дегенерирующие и пустые пыльцевые зерна не учитывались.

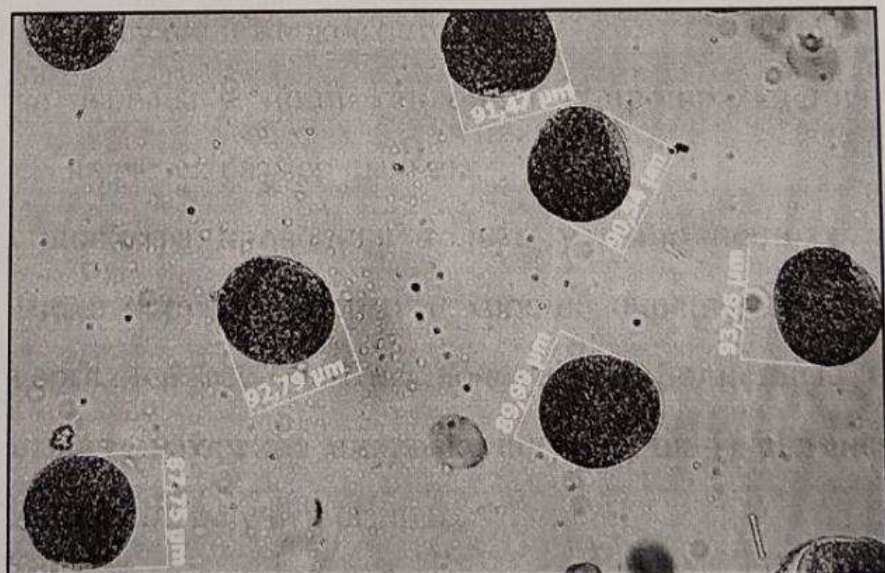


Рисунок 4 – Измерение диаметра пыльцы кукурузы в произвольно выбранном поле зрения у линии ГЛ 11; увеличение 10×20

Анализ проводился у восемнадцати линий гаплоидного происхождения. У каждой линии при анализе было исследовано от одного до трех растений. В качестве контроля использовали пыльцу двух линий ГПЛ-1 и ТМ. Измерение диаметра пыльцевых зерен проводили на временных препаратах и с каждого растения измеряли не менее 100 штук пыльцевых зерен.

Разные морфологические признаки различаются размахом варьирования. Существует ряд мер по оценке изменчивости, наиболее универсально применяемой мерой изменчивости служит коэффициент вариации (C_v). Считается, что 8-12 % – низкий уровень изменчивости.

У всех исследуемых растений кукурузы размеры пыльцевых зерен варьировали в определенных пределах.

Результаты анализа показали, что размер пыльцы у линий гаплоидного происхождения варьировал от 62,42 мкм до 121,34 мкм. Наименьшего размера пыльцевые зерна встречались у линии ГЛ 1 растения 3, а наибольшего размера у линии ГЛ 4 (23) растения 1. Микрозерна и большие пыльцевые зерна встречались в единичном количестве. У линий контроля размер пыльцы варьировал от 71,15 мкм до 107,67 мкм.

Таким образом, зарегистрированная изменчивость диаметра ПЗ у растений незначительна, поскольку значения коэффициента вариации не превышают 8 %. Эти данные свидетельствуют об однородности размера пыльцы, как у линий гаплоидного происхождения: ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 9, ГЛ 10, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 1 (23), ГЛ 2 (23), ГЛ 3 (23), ГЛ 4 (23), ГЛ 5 (23), ГЛ 6 (23), так и линий контроля: ГПЛ-1 и ТМ.

Определение достоверности различий между средними арифметическими разных вариантов показало, что зарегистрированные различия между средними размерами пыльцевых зерен некоторых линий гаплоидного происхождения и линий контроля достоверны (рисунок 5).



Рисунок 5 – Средний размер пыльцевых зерен у линий кукурузы гаплоидного происхождения

Это свидетельствует о некоторых различиях у изученных вариантов линий гаплоидного происхождения и линий контроля по этому признаку. Результаты показывают, что ГЛ 1 достоверно отличается от ТМ, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 6, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 4 (23), ГЛ 6 (23).

ВЫВОДЫ

1. В период открытого цветения была собрана и зафиксирована пыльца восемнадцати линий гаплоидного происхождения (ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 9, ГЛ 10, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 1 (23), ГЛ 2 (23), ГЛ 3 (23), ГЛ 4 (23), ГЛ 5 (23), ГЛ 6 (23)) и двух контрольных линий (ГПЛ-1 и ТМ).

2. В ходе анализа временных ацетокарминовых препаратов зрелой пыльцы исследуемых линий кукурузы были выделены два основных класса пыльцевых зерен: выполненные (нормальные) и дегенерирующие.

Максимальное значение отклоняющейся от нормы пыльцы у линий растений гаплоидного происхождения составляло 44 %. Аномальная пыльца была представлена шестью основными типами: с плазмолизом, пустые, атипичной формы, с дополнительной структурой и ярко окрашенные ПЗ.

Частота встречаемости дефектных ПЗ с наличием плазмолиза варьировала от 5,33 % до 28,17 %; пустых ПЗ – от 0,5 % до 11,83 %; нетипичной формы – от 0,17 % до 2,17 %; с дополнительной структурой – от 0,17 до 0,25 %; с красной зернистой цитоплазмой – от 0,25 до 0,33 %.

3. Морфометрический анализ пыльцы линий кукурузы показал, что размеры диаметра варьировали в пределах от 62,42 мкм до 121,34 мкм, и некоторые варианты достоверно отличались по данному показателю друг от друга. Линия ГЛ 1 достоверно отличается от ТМ, ГЛ 2, ГЛ 3, ГЛ 6, ГЛ 11, ГЛ 2 (22), ГЛ 3 (22), ГЛ 4 (22), ГЛ 4 (23), ГЛ 6 (23). Размеры пыльцевых зерен остальных линий были примерно в одинаковых интервалах. Коэффициенты вариации оказались ниже 8 %, что указывает на то, что размеры пыльцы не варьируют в широких пределах, а значит, пыльца является качественной.

4. Для селекционных работ можно рекомендовать линии с относительно низкой частотой дефектных ПЗ: ГЛ 4 (16 %) и ГЛ 4 (22) (15,33 %), так как они характеризуются высоким качеством пыльцы.

