

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

Кафедра генетики

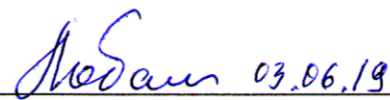
**ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ
КРАСНОДАРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 Биология
биологического факультета
Ларьковой Марины Павловны

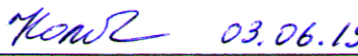
Научный руководитель

доцент каф. генетики, к.б.н.

 03.06.19 Л.П. Лобанова
подпись, дата

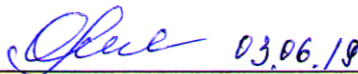
Консультант

вед. биолог лаб. биотехнологии
и репродуктивной биологии, к.б.н.

 03.06.19 А.Ю. Колесова
подпись, дата

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., доцент

 03.06.19 О.И. Юдакова
подпись, дата

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из наиболее распространенных в мире зерновых культур. Важная цель программ культивирования кукурузы является получение гибридов с более высокой урожайностью. При этом цитологическая стабильность линий является важным условием их использования в исследованиях по генетике и селекции растений.

В связи с этим представляют интерес исследования, касающиеся вопросов воспроизводства кукурузы. К числу таких работ относится изучение особенностей развития генеративных структур, непосредственно влияющих на формирование семян и, следовательно, на урожайность.

Для оценки особенностей генеративной сферы на кафедру генетики СГУ были переданы линии кукурузы из ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П. П. Лукьяненко» г. Краснодара. Так как полученные линии характеризовались образованием мелких, сморщенных и иногда беззародышевых зерновок, то предположили, что причиной дефектности зерновок могут быть гаметофитные мутации, опосредованно влияющие на процессы эмбриогенеза и эндоспермогенеза. Исследования пыльцы и зародышевых мешков позволят установить степень мужской и женской фертильности данных линий и перспективу их использования в селекционных программах.

Целью данной работы явилось определение фертильности зерновок и исследование зрелых пыльцевых зерен и зародышевых мешков у растений разных линий кукурузы краснодарской селекции.

В задачи исследования входило:

- 1) анализ строения и всхожести зерновок у разных линий кукурузы;
- 2) выявление степени дегенерации пыльцы;
- 3) выявление спектра и частоты встречаемости различных типов аномалий в строении пыльцы;
- 4) изучение особенностей строения зародышевых мешков у разных линий.

Объекты исследования:

Растения линий кукурузы Краснодарской селекции: Кр 2, 4, 6, 7, 8, 10, 19, 22. Материалом исследования послужили зерновки кукурузы, пыльца и зародышевые мешки.

Структура ВКР. ВКР включает 3 главы:

1. Обзор литературы;
2. Материал и методы исследования;
3. Результаты исследования.

Научная новизна и значимость работы. Впервые проведено исследование структуры мужского и женского гаметофитов у ряда линий Краснодарской селекции. Дана характеристика дефектности зерновок и их всхожести.

Теоретической и методологической основой исследования выступают научные труды отечественных и зарубежных ученых-биологов, посвященные актуальным проблемам развития и строения генеративных структур и использования цитозэмбриологических данных в селекции. В процессе работы были использованы такие приемы научного исследования как системный подход и статистические методы обработки информации.

Основное содержание работы. Проведенные исследования показали, что у всех исследованных линий имели разную степень выполненности и содержали зерновки разного размера. Зерновки всех початков были рассортированы на две группы: нормальные (крупные, выполненные) и дефектные (мелкие, сморщенные). По размеру мелкие были меньше крупных в 1,5-3 раза.

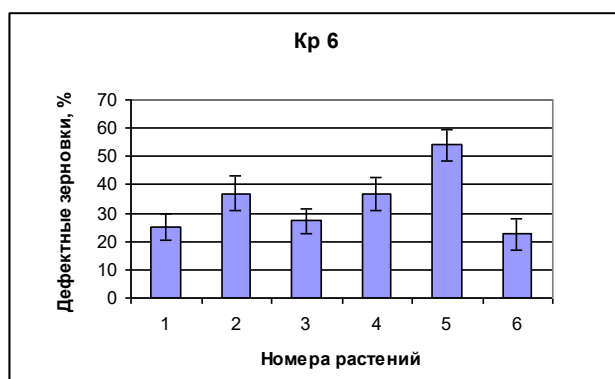
Частота образования аномальных зерновок была выше у линии Кр 7 (в среднем 48,3%), у линий Кр 6 и Кр 22 их количество в среднем равнялось 33,7 и 17,1% соответственно (таблица 1). У всех линий изменчивость растений по количеству образования дефектных зерновок была значительной. Высокая

вариабельность этого признака подтверждается значениями коэффициента вариации, который у всех линий превышает 30%.

Таблица 1 – Результаты анализа зерновок у трех линий кукурузы по величине и прорастанию

Признак	Линия	Всего проанализировано зерновок	Вариабельность признака в выборке 6 растений, %		Коэффициент вариации (v), %
			lim	$x \pm m$	
количество мелких зерновок	6	1264	22,5 – 54,0	$33,7 \pm 4,7$	34,4
	7	1366	17,6 – 87,0	$48,3 \pm 9,1$	53,4
	22	2215	7,5 – 26,8	$17,1 \pm 3,1$	43,8
количество проросших крупных зерновок	6	1250	98,3 – 26,8	$99,0 \pm 0,2$	0,5
	7	1315	91,0 – 100,0	$96,6 \pm 1,0$	2,9
	22	2345	95,0 – 100,0	$96,4 \pm 0,5$	1,4
количество проросших мелких зерновок	6	895	29,5 – 65,0	$47,0 \pm 5,8$	30,0
	7	294	40,0 – 92,5	$73,8 \pm 5,9$	22,6
	22	306	40,0 – 81,2	$65,3 \pm 6,8$	25,4,0

По частоте образования мелких и щуплых семян разные растения трех линий достоверно отличаются по этому признаку друг от друга (рисунок 1). Это может указывать на возможность успешного отбора по данному признаку, как в сторону его уменьшения, так и увеличения.



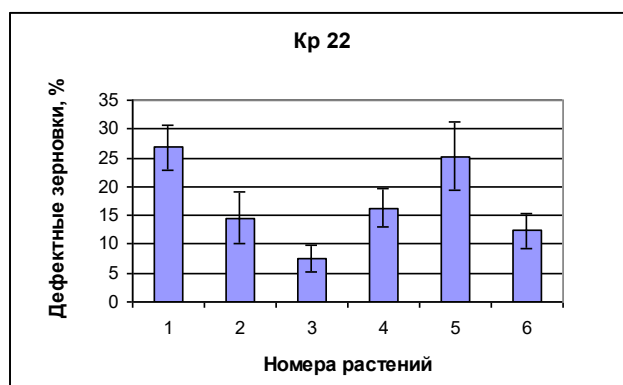


Рисунок 1 – Частота встречаемости дефектных зерновок у растений трех линий кукурузы

Проращение зерновок зависит от степени развития эндосперма и зародыша. Крупные зерновки прорастают в 96-99% случаев. У мелких зерновок всхожесть значительно снижена, что может указывать не только на недоразвитие эндосперма, но и зародыша. Статистическая обработка показала, что различия между всхожестью дефектных и нормальных зерновок у разных линий достоверны (рисунок 2)

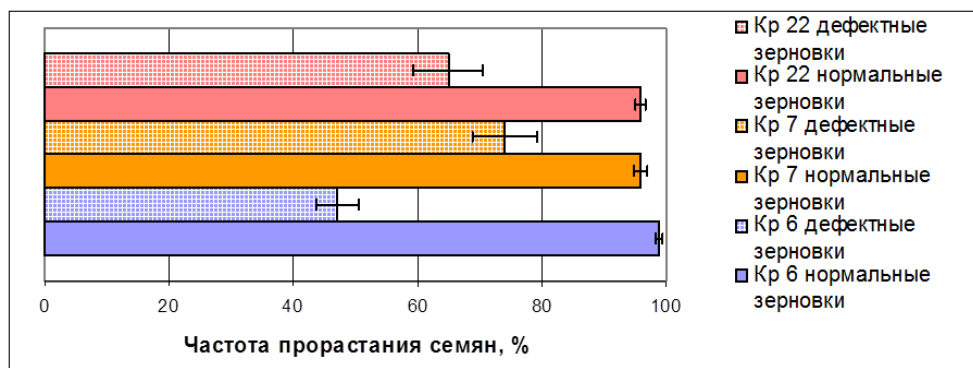


Рисунок 2 – Частота прорастания нормальных и дефектных зерновок у линий кукурузы Кр 6, 7 и 22

Пыльцевой анализ у всех 8 линий выявил образование выполненных и дегенерирующих пыльцевых зерен (рисунок 3). Выполненная пыльца имеет густо окрашенную цитоплазму и ядра, которые у дегенерирующей пыльцы разрушаются в большей или меньшей степени.



Рисунок 3 – Выполненное (а) и дегенерирующие (б) и пустое (в) пыльцевые зерна кукурузы. Увеличение $\times 400$

У всех исследованных растений кукурузы большая часть пыльцы была выполненной. Минимальное количество выполненной пыльцы обнаружено у линий Кр 2 и Кр 22 (77,8-85,5%). Эти линии характеризовались наибольшим количеством дегенерирующей пыльцы, и достоверно отличались по степени дегенерации ПЗ от шести других линий и между собой (рисунок 4)

У пяти линий количество пустых и дегенерирующих пыльцевых зерен невелико и составляет менее 5% и только у линии Кр 7 более 7%. Поэтому детальному анализу были подвергнуты выполненные пыльцевые зерна без признаков дегенерации, которые могут иметь как нормальное, так и аномальное строение.

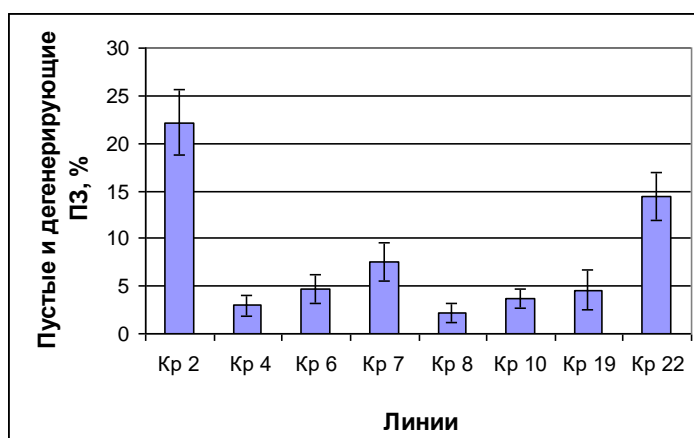


Рисунок 4 – Частота дегенерирующих и пустых пыльцевых зерен у разных линий

Выполненная пыльца была разделена на 2 группы: нормального и аномального строения. Пыльцевые зерна кукурузы нормального строения

являются трехклеточными и содержат вегетативную клетку с одним ядром и два спермия. У всех линий преобладают пыльцевые зерна нормального строения. Наибольшее количество пыльцы аномального строения содержали растения линии № 2 (в среднем 73,8%). Сравнение показало, что по суммарному количеству пыльцы аномального строения большинство линий достоверно отличаются между собой (рисунок 5).

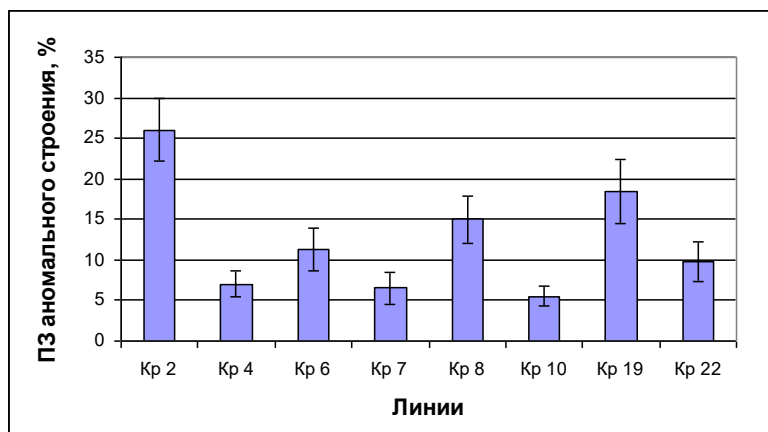


Рисунок 5 – Частота пыльцы аномального строения у разных линий кукурузы

У пяти линий со средней частотой от 0,7 до 4,2% встречались ПЗ, содержащие более трех клеток (таблица 2). Такие ПЗ содержали дополнительные ядра вегетативного типа, спермии или микроядра (рисунок 9 в, г). При наличии в пыльцевом зерне трех спермиев, визуальных различий между ними по внешнему виду не обнаружено. Спермии имели примерно одинаковый размер, форму, интенсивность окраски.

У семи линий были обнаружены ПЗ с фрагментацией хроматина. Это указывает на возможность аномальных дополнительных делений при формировании ПЗ и возможность образования несбалансированных по хромосомному составу ядер. Частота встречаемости таких пыльцевых зерен была максимальной у линии Кр 8 и составила 13,6%.

Таблица 2 – Результаты анализа выполненной пыльцы у растений различных линий кукурузы

Линия	№ растения	Число ПЗ	ПЗ нормального строения, %	ПЗ аномального строения (%) с числом ядер		
				1-2-х ядерные	3-х клеточные, с фрагментами ядер	4-х клеточные
2	3	168	78,0	22,0	0,0	0,0
	4	141	69,5	30,5	0,0	0,0
	5	154	73,8	26,2	0,0	0,0
	среднее			73,8±2,5	26,2±2,5	0,0
4	2	280	94,4	3,5	2,1	0,0
	2	349	92,5	1,3	6,3	0,0
	3	332	92,8	1,2	6,0	0,0
	среднее			93,2±0,6	2,0±0,7	4,8±1,3
6	1	180	86,6	9,1	1,0	3,3
	2	283	85,2	12,9	1,2	0,7
	3	139	94,2	5,3	0,5	0,0
	среднее			88,7±2,8	9,1±2,8	0,9±0,2
7	1	239	94,5	1,9	2,6	1,0
	2	224	93,9	3,7	1,4	1,0
	3	218	92,0	4,4	2,0	1,6
	среднее			93,5±0,7	2,5±0,6	2,0±0,6
8	1	337	91,9	0,9	7,2	0,0
	2	327	78,0	2,0	20,0	0,0
	среднее			85,0±6,9	1,4±0,5	13,6±6,4
10	1	323	97,0	1,5	1,2	0,3
	2	343	91,6	2,1	5,6	0,7
	3	347	92,9	5,0	1,4	0,7
	4	149	94,2	3,3	1,3	1,3
	5	328	96,6	2,5	0,3	0,6
	среднее			94,5±1,0	2,9±0,6	2,0±0,0
19	4	112	75,0	18,7	0,9	5,4
	5	94	84,0	10,9	3,0	2,1
	6	175	85,7	12,3	0,0	2,0
	среднее			81,6±3,3	14,0±2,2	1,3±0,9
22	4	225	86,8	5,2	4,0	4,0
	5	225	91,6	0,3	1,0	7,1
	6	203	95,1	3,7	2,7	4,5
	среднее			90,2±2,4	3,0 ±2,3	2,6±0,9

Строение зародышевых мешков изучали у двух линий Кр 6 и 7 у пяти растений. Разные растения содержат от 90 до 98% ЗМ нормального строения.

Нормальные зародышевые мешки содержат трехклеточный яйцевой аппарат, центральную клетку с двумя полярными ядрами или одним полярным ядром и комплекс антиподальных клеток.

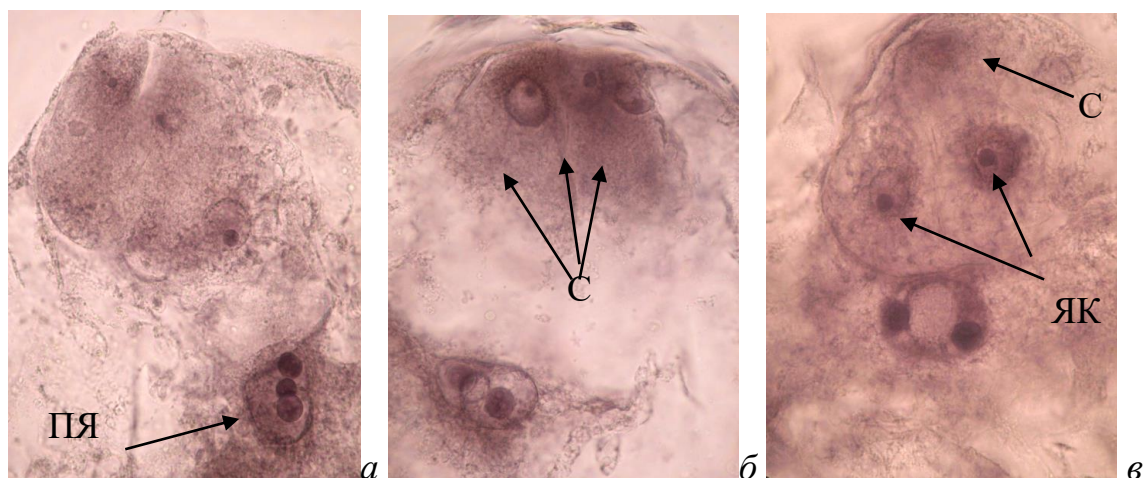
Частота встречаемости зародышевых мешков аномального строения у линий Кр 6 и Кр 7 незначительна (таблица 3). Среди аномалий ЗМ встречались: зародышевый мешок содержащий три полярных ядра, зародышевые мешки с синергидоподобными яйцеклетками и зародышевые мешки с яйцеклеткоподобными синергидами. Частота зародышевых мешков с аномальной дифференцировкой яйцевого аппарата варьировала у разных растений от 2 до 10%.

Таблица 3 – Результаты морфометрического анализа пыльцевых зерен у диплоидных линий кукурузы

Линия	Число проанализированных ПЗ	Диаметр ПЗ, мкм			Коэффициент вариации (v), %
		средний размер $\bar{x} \pm m$	минимальный	максимальный	
2	218	131,6±1,4	90,4	198,7	15,7
6	314	108,4±1,0	72,1	146,5	15,6
7	310	93,1±0,5	74,7	120,6	10,1
19	335	122,2±0,7	51,5	169,2	11,1
22	527	92,9±0,4	58,4	112,8	9,2

Доминировали в этой группе зародышевые мешки с синергидоподобными яйцеклетками, в которых яйцеклетка имела морфологическое сходство с синергидой (рисунок 6). Такие ЗМ были обнаружены у всех исследованных растений с частотой от 2 до 10 %. ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами, в которых ядра находилось на апикальном конце клетки, образовывались реже. Они зарегистрированы у двух

растений, относящихся к разным линиям с частотой 3,4% (линия Кр 6) и 1,6% (линия Кр 7).



а – три полярных ядра; *б* – синергидоподобная яйцеклетка;
в – яйцеклеткоподобная синергида

Рисунок 18 – Зародышевые мешки кукурузы аномального строения

Заключение. Данные пыльцевого анализа и анализа ЗМ позволяют предположить варианты образования дефектных зерновок. Щуплые зерновки с недоразвитым эндоспермом могут появиться при оплодотворении центральной клетки мужскими гаметами с несбалансированным хромосомным набором. На это указывает: -полиспермия, -фрагментация спермиев, - появление крупных и мелких пыльцевых зерен.

Причиной недоразвития или отсутствия зародыша, а, следовательно, невсхожести семян, может быть оплодотворение яйцеклетки дефектными спермиями и ее отсутствие в случае дифференциации по типу синергиды.

Считаем, что исследованные линии малоперспективными для получения гетерозисных гибридов. Отдельные линии могут быть использованы в работах по клеточной биологии. Перспективными для поиска мутаций, влияющими на онтогенез пыльцы, являются линии Кр 2, 8, 19 и 22.

ВЫВОДЫ

1. У всех изученных линий кукурузы формируются дефектные мелкие зерновки (без зародышей, с недоразвитыми зародышами, с различной степенью выполненности эндосперма).
2. Частота образования аномальных зерновок у линий Кр 6, 7 и 22 варьирует от 17,1 до 48,3%. Достоверные отличия отдельных растений каждой линии могут свидетельствовать о возможности успешного отбора по данному признаку.
3. Всхожесть мелких зерновок достоверно ниже нормальных и у разных линий составляет 47-74%.
4. Дефектные пыльцевые зерна у всех исследованных линий представлены двумя основными типами: дегенерирующими и выполненными аномального строения. Дегенерирующие пыльцевые зерна встречались с частотой от 2,2 до 22,2% и доминировали у линий Кр 2 и Кр 22.
5. Частота пыльцевых зерен с различными аномалиями строения, проявляющимися в уменьшении или увеличении числа ядер, варьирует у разных линий от 5,4 до 26,2%.
6. У семи линий обнаружена пыльца с дополнительными спермиями и с фрагментацией спермиев. Полиспермия и морфологическая неоднородность спермиев указывает на возможность аномальных делений в спермиогенезе и образование мужских гамет с несбалансированным хромосомным набором.
7. Зародышевые мешки аномального строения у растений линий Кр 6 и Кр 7 встречаются с частотой от 2 до 14%. Среди аномальных доминирую ЗМ с синергидоподобными яйцеклетками.
8. Обнаруженные структурные изменения в строении пыльцы и зародышевых мешков могут быть главными причинами нарушений эмбрио- и эндоспермогенеза, приводящими к образованию дефектных зерновок.