

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ИЗУЧЕНИЕ МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ
РАЗНОГО УРОВНЯ ПЛОИДНОСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 422 группы

направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Магеррамова Шамиля Валеховича

Научный руководитель

к.б.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание



подпись, дата

06.06.16

Л. П. Лобанова

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

д.б.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание



подпись, дата

06.06.16

О. И. Юдакова

инициалы, фамилия

Саратов 2016

Введение. В селекции кукурузы важным направлением является получение и использование полиплоидных форм. Однако переход на другой уровень ploидности может приводить к снижению мужской и женской фертильности, степени завязываемости и всхожести семян. Цитоэмбриологические исследования позволяют выявить причины стерильности и изменений в развитии генеративных структур.

Исследования качества пыльцы у тетраплоидной формы кукурузы КрП-1 и полученных на ее основе триплоидных растений обнаружили достаточно широкий спектр отклонений в строении пыльцевых зерен по сравнению с диплоидными линиями. Среди них были выявлены пыльцевые зерна аномальной формы, не описанные ранее у кукурузы, что позволяет предположить их специфичность именно для изучаемой тетраплоидной формы. Это были разнообразные по внешнему виду и клеточной структуре пыльцевые зерна, причины и механизмы формирования которых неизвестны. Все это делает актуальным исследование особенностей микроспорогенеза у данных полиплоидных растений и определение его зависимости от уровня ploидности генома.

Целью данной работы явилось исследование микроспорогенеза в материнских клетках пыльцы у полиплоидных форм кукурузы КрП-1.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

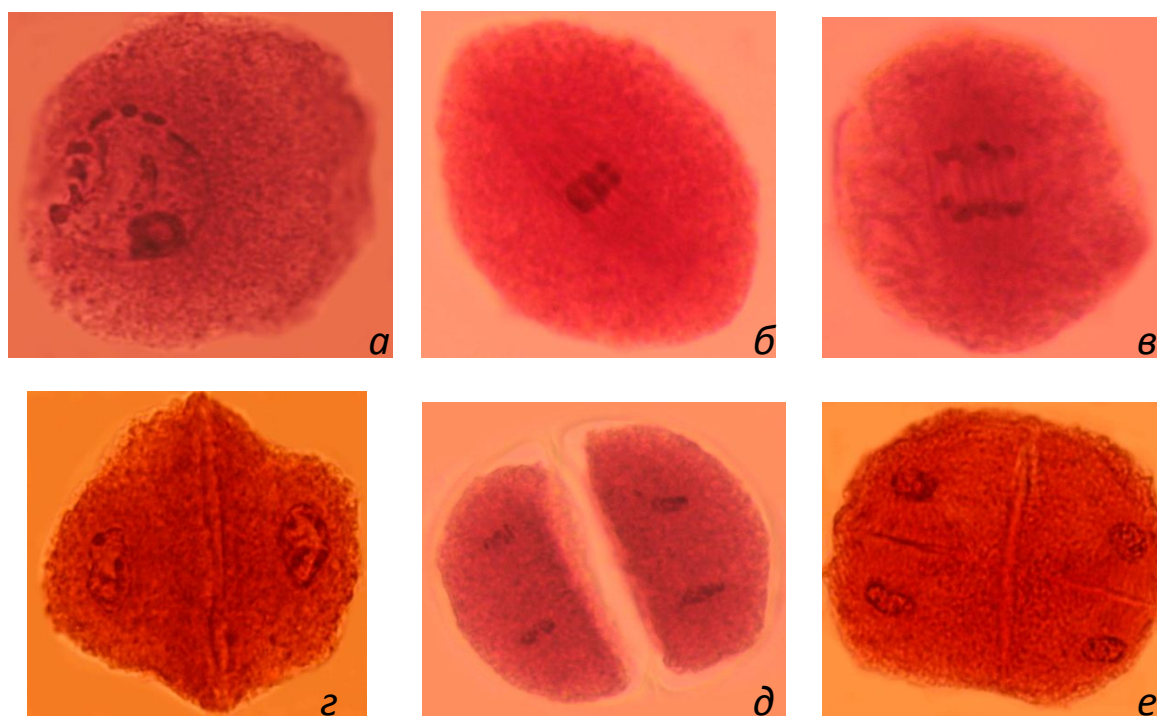
- 1) изучение особенностей деления ядер;
- 2) изучение особенностей цитокинеза в ходе мейотических делений;
- 3) характеристика образующихся спорад микроспор;
- 4) изучение зависимости микроспорогенеза от уровня ploидности растений.

Материалом исследования послужили микроспороциты и спорады микроспор тетраплоидных растений кукурузы формы КрП-1 и полученных на ее основе триплоидных растений. В качестве контроля использовались диплоидные растения линии ГПЛ.

Теоретической и методологической основой исследования выступают научные труды отечественных и зарубежных ученых-биологов, посвященные актуальным проблемам развития и построения. В процессе работы были использованы такие приемы научного исследования как системный подход, статистические методы обработки информации.

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, она включает введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования и результаты исследования), заключение и список использованных источников.

Основное содержание работы. Проведенный анализ позволил получить достаточно полное представление о нормальном ходе мейотических делений микроспороцитов кукурузы и качественном спектре отклонений от него (рисунок 1).



а – профазы I; *б* – метафазы I; *в* – анафазы I; *г* – телофазы I; *д*– анафазы II; *е* – телофазы II

Рисунок 1 – Мейотические деления в микроспороцитах пыльцы.

Увеличение $\times 400$

Микроспороциты с нарушением мейоза у диплоидных растений единичны. У полиплоидных растений микроспороциты с нормальным мейозом также составляют значительную часть. Но у всех полиплоидных растений зарегистрирован достаточно широкий спектр отклонений в ходе мейотических делений и тетрадогенеза, включающий нарушения кардио- и цитокинеза, образование монад, диад, триад и полиад, а также микроспор с атипичной формой клеток (таблица 1).

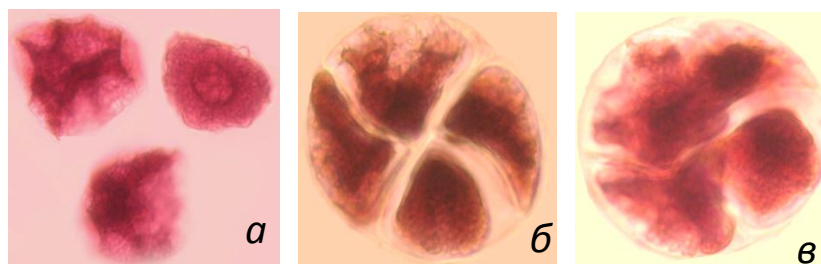
Таблица 1 – Результаты анализа микроспороцитов и спор микроспор у разноплоидных растений кукурузы

Вариант	Число проанализированных растений	Аномалии в микроспорогенезе, %					
		мейоз		споры			атипичная форма клеток
		кариокинез	цитокинез	атипичные тетрады	монады, диады, триады	пентады, гексады, гептады	
КрП-1, 4n	14	6,4	47,4	10,9	3,1	2,2	6,1
КрП-1 × ГПЛ, 3n	7	1,2	4,1	3,1	1,2	0,3	1,3
ГПЛ, 2n	5	0,0	1,5	0,0	1,5	0,5	0,0

Максимальное количество нарушений в кардиокинезе обнаружено у тетраплоидов. Однако тетраплоидные растения различались по частоте нарушений, процент аномалий у которых варьировал от 4% до 12,1% растений. Зарегистрированные различия между растениями не достоверны и, вероятно, объясняются случайными причинами. У тетраплоидов при анализе первого мейоза были обнаружены слияния хромосом, что приводило к появлению хромосомных мостов в анафазе I, отставанию хромосом и их разбросу по веретену деления. Во втором мейозе у тетраплоидов были зарегистрированы асинхронные деления ядер, нарушения ориентации веретен деления, трехполюсные деления и слияние веретен деления.

Частота нарушений у триплоидных растений значительно меньше, например, и в среднем составила 1,2 %, в то время как у тетраплоидов она в среднем равнялась 6,4 % . Однако у триплоидов значительно чаще

наблюдаются дегенерирующие микроспороциты начиная со стадии профазы первого деления мейоза (рисунок 2). Это свидетельствует о значительных нарушениях в микроспорогенезе триплоидных растений, несовместимых с жизнью клетки. Вероятно, процесс дегенерации на этом этапе может отбраковывать у триплоидов огромное количество микроспор с несбалансированным набором хромосом.



a – на стадии профазы I; *б, в* – на стадии тетрады микроспор

Рисунок 2 – Дегенерация микроспороцитов на разных стадиях развития у триплоидной кукурузы

Среди различных вариантов нарушений цитокинеза у тетраплоидов можно выделить два основных, с наиболее значимыми последствиями для развития микроспор и пыльцы. Это: отсутствие цитокинеза после первого или второго деления мейоза и неполное заложение перегородок в виде «насечек» в центре клетки или с внешней стороны. Такие аномалии чаще наблюдались у тетраплоидов после первого деления мейоза, причем в основном встречались микроспороциты с неполным заложением перегородок. Общее количество нарушений цитокинеза у разных тетраплоидных растений варьировало от 9 до 69 % (таблица 2). У диплоидных растений линии ГПЛ нарушений цитокинеза в мейозе не обнаружено. Спектр обнаруженных аномалий представлен на рисунке 3. В телофазе первого мейотического деления встречались микроспороциты с атипичной формой фрагмопласта, с полным отсутствием цитокинеза после деления ядер, но большая часть нарушений у тетраплоидных растений в мейозе I представлена образованием «насечек», то есть неполных перегородок между дочерними клетками. Такие нарушения зарегистрированы у всех проанализированных тетраплоидных растений с частотой от 8,7 до 52,4 %.

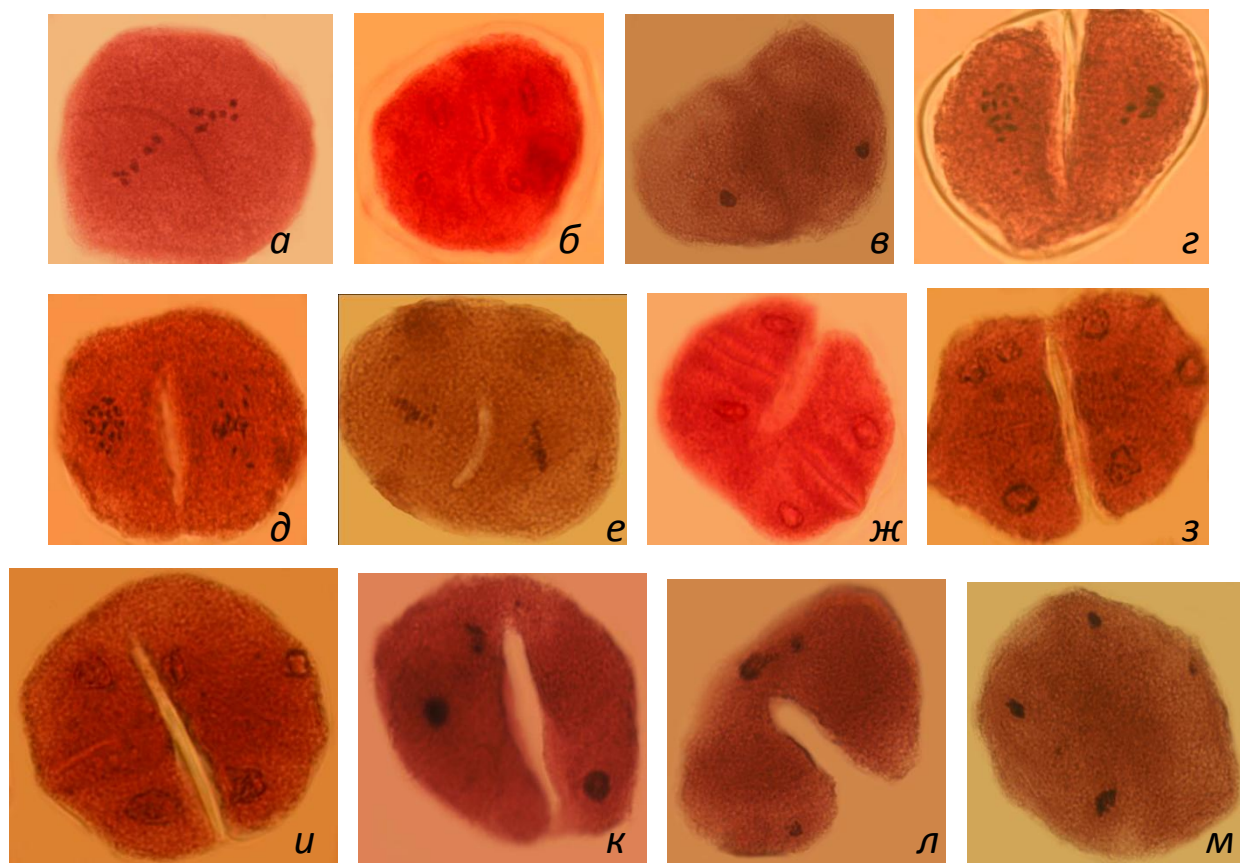
Все разнообразие этого типа аномалий цитокинеза можно свести к нескольким основным: заложению перегородки в виде «насечки» с одной или двух сторон, одного или двух фрагментов перегородки в центре (рисунок 3 г–н).

Таблица 2 – Варианты цитокинеза в мейозе полиплоидных растений кукурузы КрП-1

№ растения, плоидность	Цитокинез, %					
	I мейотическое деление			II мейотическое деление		
	нормальный	неполный	Отсутствует	нормальный	неполный	отсутствует
515-7, 4n	31,0	27,8	41,2	0,0	0,0	0,0
527, 4n	91,3	8,7	0,0	0,0	0,0	0,0
535-1, 4n	47,6	52,4	0,0	100,0	0,0	0,0
535-2, 4n	58,2	40,2	1,6	98,4	1,6	0,0
431-9, 4n	61,2	38,8	0,0	79,6	16,6	3,8
3.1, 3n	99,9	0,0	0,1	99,6	0,0	0,4
3.2, 3n	99,8	0,0	0,2	99,4	0,1	0,6
3.3, 3n	100,0	0,0	0,0	97,1	0,0	2,9
3.4, 3n	98,8	0,0	0,2	99,8	0,0	0,2
3.5, 3n	100,0	0,0	0,0	98,7	0,1	1,3
3.6, 3n	100,0	0,0	0,0	99,2	0,0	0,8
3.7, 3n	99,9	0,0	0,1	99,4	0,0	0,6

Такие нарушения зарегистрированы у всех проанализированных тетраплоидных растений с частотой от 8,7 до 52,4 %. Все разнообразие этого типа аномалий цитокинеза можно свести к нескольким основным: заложению перегородки в виде «насечки» с одной или двух сторон, одного или двух фрагментов перегородки в центре (рисунок 3 г–н).

Результатом различных вариаций карио - и цитокинеза мейоза у полиплоидных форм кукурузы явились разнообразные аномальные споры. В ходе проведенного анализа были обнаружены тетрады микроспор нетипичной формы и споры с числом клеток, отличным от четырех.



а, б – заложение изогнутой и дугообразной пластинки фрагмопласта; *в* – отсутствие перегородки после мейоза I; *г - и* – разные варианты неполного заложения клеточных перегородок в виде «насечек» с одной или двух сторон, или в виде «тоннеля» в центре; *к, л* – микроспороциты с неполным цитокинезом после мейоза I и отсутствием цитокинеза после мейоза II; *м* – отсутствие цитокинеза после мейоза I и II

Рисунок 3 – Нарушения заложения клеточных перегородок в мейозе у тетраплоидной кукурузы. Увеличение $\times 400$

У атипичных тетрад было изменено взаимное расположение спор относительно друг друга, и тетрады приобретали линейную, т-образную форму или имели различные косые перегородки (таблица 3). Эти вариации являются следствием неправильной ориентации веретен во втором делении мейоза, которые в клетках диады могли располагаться перпендикулярно относительно друг друга или под различными углами.

Таблица 3 – Результаты анализа спорад у растений кукурузы разной пloidности

Вариант, пloidность	№ растения	Число проанализированных спорад	Количество атипичных спорад, %	Спорады атипичного строения, %						
				тетрады			монады	диады	триады	пентады, гексады
				т-образные	линейные	другие типы тетрад				
КрП-1, 4n	172-1	600	11,9*	2,5	2,3	2,5	0,3	0,3	0,5	3,5
	172-2	344	16,8**	2,6	0,9	6,6	0,5	0,6	0,9	4,7
	527	146	12,5*	7,3	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	2,2
	535-2	153	12,6*	1,9	0,7	4,1	0,2	0,7	0,7	4,3
	535-6	270	5,1	1,1	0,7	1,1	0,0	0,0	0,0	2,2
КрП-1 × ГПЛ, 3n	1	530	1,7	0,6	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
	2	718	1,8	0,0	0,6	0,6	0,0	0,6	0,0	0,0
	3	446	6,0	0,7	1,8	0,4	0,0	1,8	1,1	0,2
	4	321	2,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,2	0,0
	5	378	2,4	0,2	0,0	0,5	0,2	0,0	1,3	0,2
	6	480	1,7	0,2	0,4	0,2	0,1	0,4	0,4	0,0
	7	457	1,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,6	0,2
ГПЛ, 2n	1-7	711	2,2	0,4	0,2	0,9	0,0	0,3	0,4	0,0

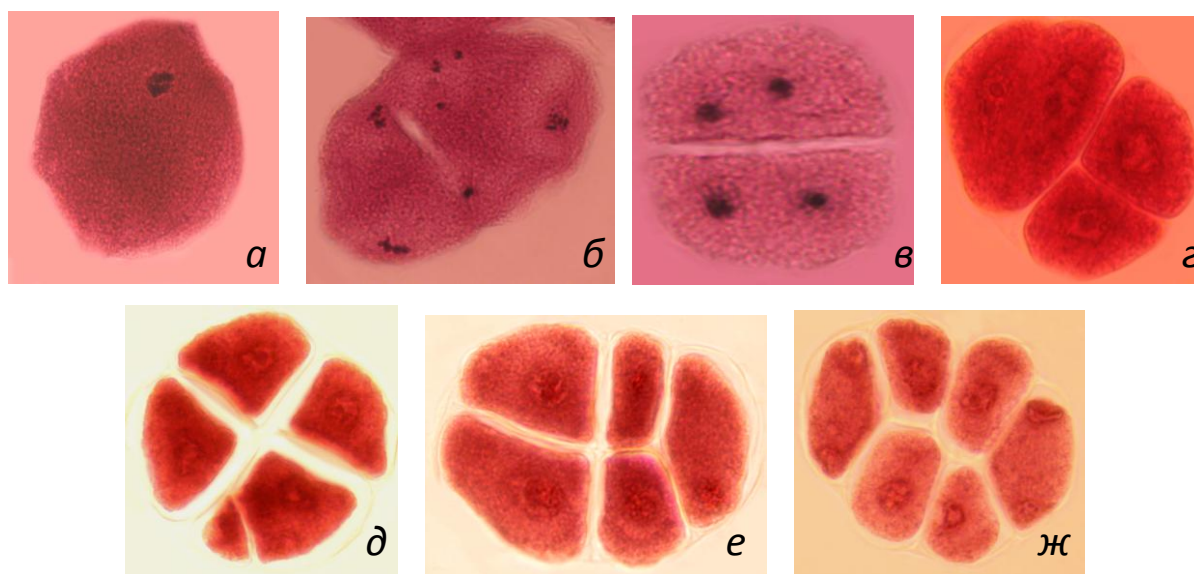
Примечания: * Различия с линией ГПЛ достоверны на уровне значимости 0,05.

** Различия с линией ГПЛ достоверны на уровне значимости 0,01.

К тетрадам атипичного строения были также отнесены тетрады с микроклетками, появление которых обусловлено нарушениями при расхождении хромосом. Отдельные хромосомы, находящиеся вне хромосомных групп, могут служить причиной образования микроядер, а позже и микроклеток. Причиной образования спор разной величины может быть также неравное распределение хромосом между полюсами.

У многих полиплоидных растений встречались монады, диады и триады микроспор (таблица 3), частота образования которых варьировала от 0,2 до 2,9 %. Значительная часть монад имела «насечку» из частично сформировавшейся клеточной перегородки. Это полностью согласуется с данными о частичной или полной блокировке цитокинеза у этих растений.

Нарушения кариокинеза и, прежде всего, отставания хромосом в анафазе I и II и образование трехполюсных веретен деления могут приводить к полиадам, то есть структурам, содержащим более 4-х спор (таблица 3). Пентады и гексады были обнаружены у всех пяти проанализированных на тетрадогенез растений, и у трех растений обнаружены единичные гексады (рисунок 4 ж). Размеры клеток в полиадах могли быть одинаковыми или значительно различаться (рисунок 4).



a – монада; *б*– рассеченная монада; *в* – диада с двумя ядрами в клетках; *г* – триада с одной и двумя ядрами в клетках; *д, е* – пентады; *ж* – гексада
Рисунок 4 – Типы спорад микроспор у полиплоидной кукурузы.

Увеличение × 400

Важной особенностью микроспорогенеза у всех полиплоидных растений было обнаружение микроспороцитов атипичной формы. Микроспороциты атипичной формы встречались на разных стадиях микроспорогенеза, начиная с профазы первого мейотического деления и заканчивая сформировавшимися тетрадами. Они были обнаружены у всех проанализированных растений: 15 тетраплоидных и 7 триплоидных. На рисунке 5 представлена частота образования микроспороцитов у разных тетраплоидных растений.

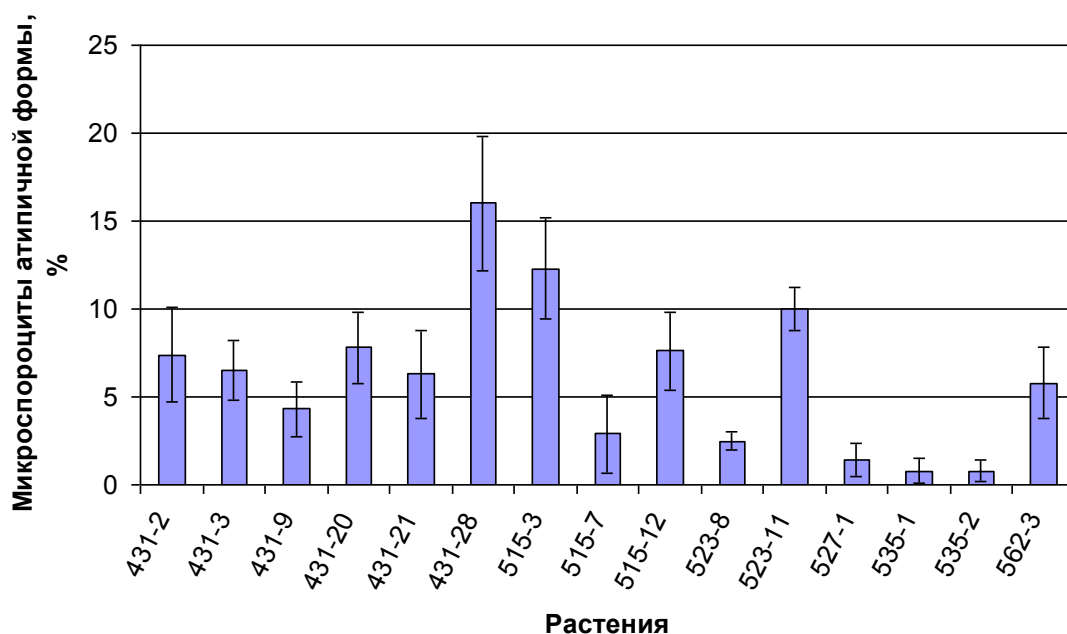
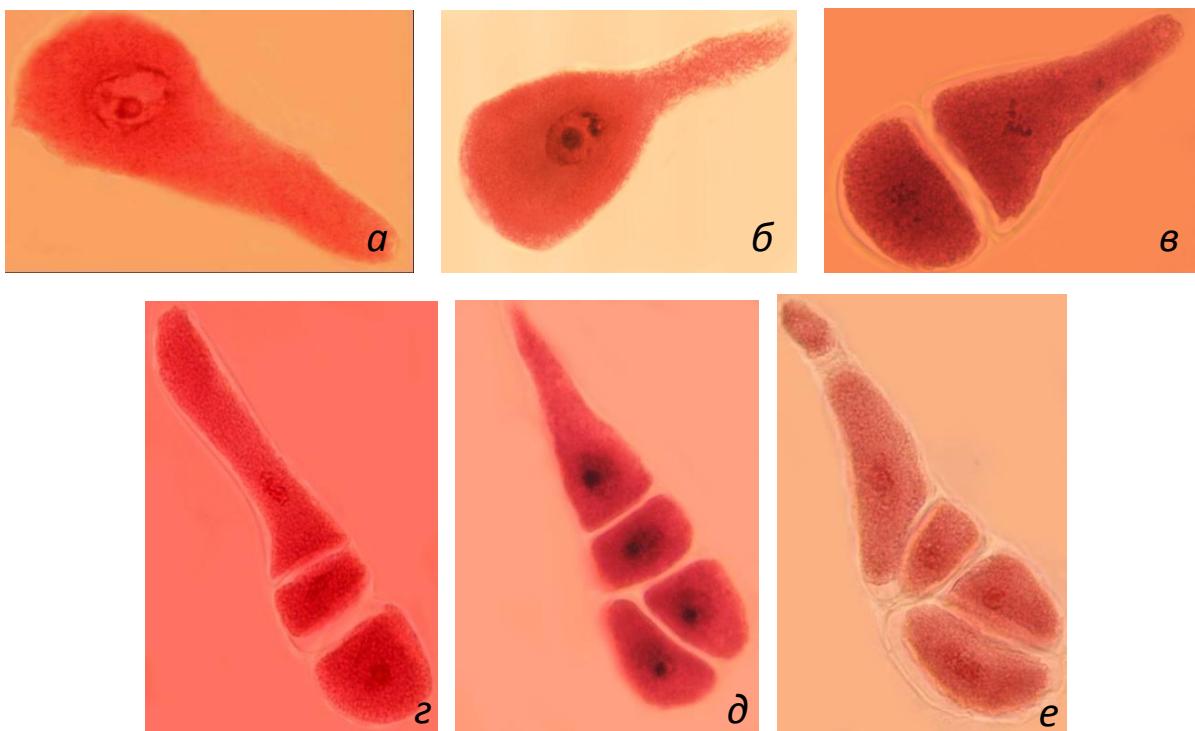


Рисунок 5 – Соотношение микроспороцитов аномальной формы у тетраплоидных растений кукурузы

На стадии профазы I атипичные микроспороциты отличались большими размерами и вытянутой формой (рисунок 6 а, б). Ядро всегда располагалось в расширенной части. Микроспороциты атипичной формы встречались и на более поздних стадиях мейоза (рисунок 6 в-е). Следует отметить, что диплоидных растений линии ГПЛ обнаружено два микроспороцита атипичной формы.

Регистрация атипичных микроспороцитов на стадии профазы I может свидетельствовать, что возможной причиной их появления является дефект внутриклеточного цитоскелета, необходимого для поддержания формы клетки, а не только нарушения кардио- и цитокинеза в микроспорогенезе.

Аномально удлиненные микроспоры были обнаружены в диадах микроспор, триадах, тетрадах, пентадах и гексадах (таблица 3, рисунок б). . Наиболее часто микроспоры атипичной формы встречались в тетрадах микроспор.



a, б – профаза I; *в* – метафаза II; *г* – триада микроспор; *д* – тетрада; *е* – пентада

Рисунок 6 – Микроспороциты и микроспоры атипичной формы.

Увеличение $\times 400$

Заключение. Таким образом, структурно-морфологический анализ нормальной и измененной цитологической картины позволил выявить особенности микроспорогенеза у растений полиплоидных форм кукурузы. В частности, были описаны малоизвестные для кукурузы особенности цитокинеза, включающие его блокировку или неполный цитокинез в виде «насечек» или «тоннеля». Выявлены две группы специфических аномалий, неизвестных или мало известных для кукурузы: это образование микроспороцитов атипичной формы и полиад, для выяснения механизмов появления которых необходимы дополнительные исследования.

Обнаруженные у тетраплоидных растений нарушения цито- и кариокинеза в ходе мейотических делений микроспороцитов являются причиной образования монад, триад, пентад и других атипичных вариантов спорад. Многие из этих вариантов могут быть связаны с образованием реституционных ядер и многоядерных микроспор. Эти аномалии имеют

биологически значимые последствия и ведут, например, к формированию нередуцированных или анеуплоидных гамет. Многие из обнаруженных нарушений мейоза могут быть причиной частичной стерильности пыльцы у тетраплоидных и триплоидных растений. Однако высокий процент образования типичных микроспор свидетельствуют о возможности использования тетраплоида КрП-1 в селекции в качестве доноров диплоидных гамет. Не исключено также, что исследованная тетраплоидная форма является интересным материалом для исследования онтогенеза пыльцы и понимания разнообразных задач клеточной биологии.

Выводы. 1. Частота микроспороцитов с нарушениями кариокинеза у различных тетраплоидных растений составила 4–12 %, а у триплоидных – 2-5,3 %. Аномалии кариокинеза представлены отставанием и расположением отдельных хромосом вне основных хромосомных групп, изменением ориентации веретен деления, их слиянием и образованием трехполюсных веретен деления.

2. Частота нарушений цитокинеза у разных тетраплоидных растений варьирует от 8,7 до 69 %, а у триплоидных – от 0,5 до 3 %. Нарушения цитокинеза представлены двумя основными типами: образованием неполной клеточной перегородки с внешней стороны или в центре клетки и отсутствием клеточной перегородки после мейоза I и/или мейоза II.

3. Различные вариации карио - и цитокинеза привели к образованию различных типов спорад: монад, диад, триад, атипичных тетрад и полиад. Их появление свидетельствует о возможности образования у тетраплоидных растений нередуцированных и анеуплоидных пыльцевых зерен.

4. Микроспороциты атипичной формы обнаружены у всех исследованных полиплоидных растений. Их появление зарегистрировано на всех стадиях мейоза и в тетрадогенезе.

5. Триплоидные растения характеризуются меньшим числом нарушений карио - и цитокинеза. Вероятно, причиной является массовая дегенерация микроспороцитов, начиная со стадии профазы первого деления мейоза

