

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


Кафедра генетики

**ЯВЛЕНИЕ ПОЛИЭМБРИОНИИ У КУКУРУЗЫ ЛИНИИ АТ-1
В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO***

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 422 группы
Направления 06.03.01 – «Биология»
биологического факультета
Польской Марины Владиславовны


Научный руководитель:
доцент кафедры генетики,
к.б.н.

 7.06.16 Т. А. Алаторцева

Научный консультант:
ведущий биолог
УНЦ «Ботанический сад СГУ»

 7.06.16 Н. В. Апанасова

Зав.кафедрой генетики,
д.б.н., профессор

 7.06.16 О.И.Юдакова

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Полиэмбриония – широко распространённое явление у покрытосеменных растений. Исследование этого процесса достаточно перспективно, так как открывает возможности для производства чистых линий, гаплоидных и гомозиготных диплоидных форм, для улучшения посевных качеств семян, получения высокоурожайных сортов. Однако использование в полной мере потенциала полиэмбрионии в селекционно-генетической работе не позволяет недостаточная изученность механизмов её индукции. Высокая частота встречаемости семян с несколькими зародышами, в большей степени характерна для апомиктических видов и видов с его элементами, что связано с созданием цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии в ходе развития женских генеративных структур. К их числу относится формирование нескольких зародышевых мешков в одном семязачатке, нескольких яйцеклеток в одном мегаспорофите (полигаметия), яйцеклеткоподобных синергид или антипод (апогаметия) (Виноградова, 2009; Магешвари, 1954; Хохлов, 1968; Звержанская, 1983; Селиванов, 1983; Шишкинская, Юдакова, Тырнов, 2005; Юдакова, 2014).

У половых видов многозародышевость встречается реже, но может быть индуцирована экспериментальным воздействием и в культуре *in vitro*.

В связи с этим, данное исследование, посвященное сравнительному изучению процесса полиэмбрионии в условиях *in vivo* и *in vitro* у апомиктической линии кукурузы актуально и практически значимо.

Новизна работы заключается в том, что впервые индукция предпосылок к многозародышевости в сравнительном аспекте рассматривается у уникальной линии кукурузы АТ-1, имеющей предрасположенность к партеногенезу.

Цель настоящей работы. Оценить индуцирующее влияние условий культуры *in vitro* на возникновение предпосылок к полиэмбрионии у апомиктической линии кукурузы АТ-1.

Задачи эксперимента:

1. Изучить спектр изменений, возникающих в мегагаметофите апомиктической линии кукурузы в условиях *in vitro* и *in vivo*.
2. Определить оптимальные сроки задержки опыления для выявления эмбриологических предпосылок к полиэмбрионии у апомиктической линии АТ-1.
3. Проследить в динамике процесс автономного формирования проэмбрио *in vitro* и *in vivo* и определить основные источники многозародышевости у кукурузы линии АТ-1.
4. Оценить влияние условий развития завязей на частоту эмбриогенеза и полиэмбрионии у данной линии кукурузы.

Краткая характеристика материалов и методов. Объектом исследования являлась апомиктическая линия кукурузы АТ-1, из коллекции Отдела генетики репродуктивной биологии Ботанического сада СГУ.

Линия АТ-1 имеет наследственную предрасположенность к гаплоидному партеногенезу. Линия сходна с псевдогамными апомиктами, у которых для нормального развития эндосперма необходимо оплодотворение, хотя зародыш до конца развивается автономно.

Растения выращивали в полевых условиях. Початки до появления рылец, для исключения опыления, накрывали пергаментными изоляторами. Для эксперимента отбирались завязи спустя сутки после появления рылец (пестичных нитей) из обёрточных листьев початка. Часть завязей от каждого початка отбиралась для цитоэмбриологического анализа, другая часть – помещалась на питательную среду. В процессе культивирования проводилась темпоральная фиксация в ацеталкоголе (1:3) эксплантированных завязей, при достижении ими «возраста»: 3, 5, 7, 10, 14 суток (от момента появления рылец на початке, включая период *in vitro*). Одновременно проводилась фиксация завязей в тех же «возрастов» из початков полевых растений.

Питательная среда для культивирования содержала макро- и микроэлементы MS, витамины, сахарозу (9,0 %), 2,4- Д (2,0 мг/л), агар-агар.

В качестве дезинфицирующих средств для эксплантов использовали

этанол (70%) и хлорсодержащее дезинфицирующее средство. Обработку початков проводили в последовательности: обработка 70%-ным этанолом (30 сек.), выдерживание соцветий в растворе «Белизны» с содержанием активного хлора 70 – 85 г/л (в разведении 1:6), трёхкратная промывка 3-5 порциями стерильной дистиллированной воды.

Зародыши срезали с оси початка и помещали на питательную среду по три завязи в каждую пробирку, содержащую 7 мл. питательной среды.

Для приготовления цитозембриологических препаратов зародышевые мешки выделяли методом ферментативной мацерации с последующей диссекцией семяпочек.

Достоверность полученных результатов оценивалась по методу Фишера.

Фотографирование проводили с использованием программ визуализации изображения «Zoombrowser» на микроскопах «AxioStar Plus» и «AxioScope».

Структура и объем работы. Работа изложена на 40 страницах машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с таблицами, рисунками, выводы. Список использованных источников содержит 62 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Изучение спектра изменений в зародышевых мешках кукурузы при задержке опыления

В процессе исследования было установлено, что развитие зародышевых мешков в отсутствие опыления как в изолированных завязях *in vitro*, так и *in situ*, в початках на материнских растениях в полевых условиях происходит сходным образом. На таблицах 1 и 2 видно, что это сходство проявляется в течение всего изучаемого периода от трёх суток от начала цветения (момент появления пестичных нитей) до двух недель.

К моменту появления рылец на початке зародышевые мешки в завязях уже сформированы и включают, как показано на рисунке 1, яйцеклетку, две синергиды, центральную клетку с двумя полярными ядрами, около двадцати антипод.

При задержке опыления (3 и более суток) в мегагаметофите обнаруживаются как одиночные, так и дополнительные проэмбрио, и также, изображенные на рисунке 2, аномалии в структуре яйцевого аппарата: две яйцеклетки, одна или две яйцеклеткоподобные синергиды, проэмбрио в присутствии яйцеклетки.

Таблица 1 – Частота встречаемости зародышевых мешков разного строения в неопылённых завязях кукурузы линии АТ-1 в культуре *in vivo* и *in vitro*.

«Возраст завязей», сутки	Условия развития	Количество ЗМ								
		Всего	Типичный ЗМ	Про-эмбрио	2 яйцеклетко-подобные синергиды	1 яйцеклетко-подобная синергида	2 яйцеклетки	2 проэмбрио	Яйцеклетка + проэмбрио	Дегенерирующие ЗМ
3	<i>in vivo</i>	109	96,3	0	0	0,9	0,9	0	0	1,8
	<i>in vitro</i>	108	95,4	0	0,9	1	0	1	0	4
5	<i>in vivo</i>	106	85,8	5,7	0,0	0,9	1,9	0,9	0,9	3,8
	<i>in vitro</i>	104	91,3	2,9	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	3,8
7	<i>in vivo</i>	105	86,7	3,8	1,0	1,9	1,0	1,0	0,0	4,8
	<i>in vitro</i>	107	88,8	2,8	1,9	0	1,9	1,9	0	2,8
10	<i>in vivo</i>	103	80,6	5,8	1,0	3,9	1,9	2,9	1,9	1,9
	<i>in vitro</i>	110	71,8	6,4	2,7	0,9	2,7	3,6	0,9	10,9
14	<i>in vivo</i>	103	69,9	4,9	0,0	5,8	4,9	2,9	1,0	10,7
	<i>in vitro</i>	107	74,8	8,4	4,7	0,0	0,0	4,7	0,9	6,5

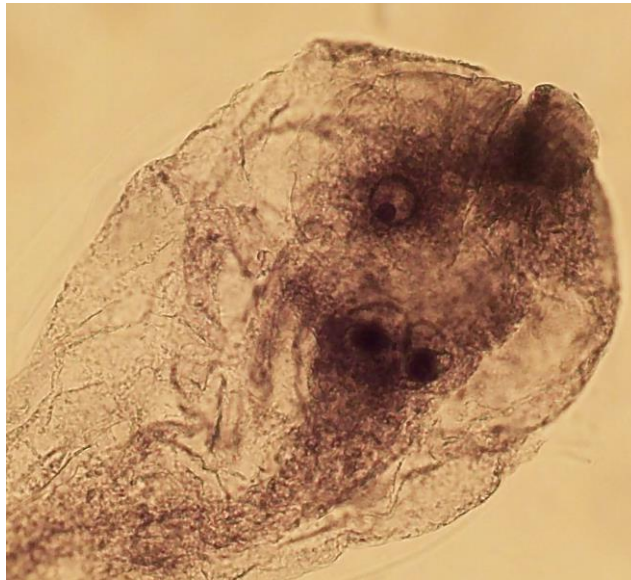


Рисунок 1 – Зародышевый мешок кукурузы типичного строения.

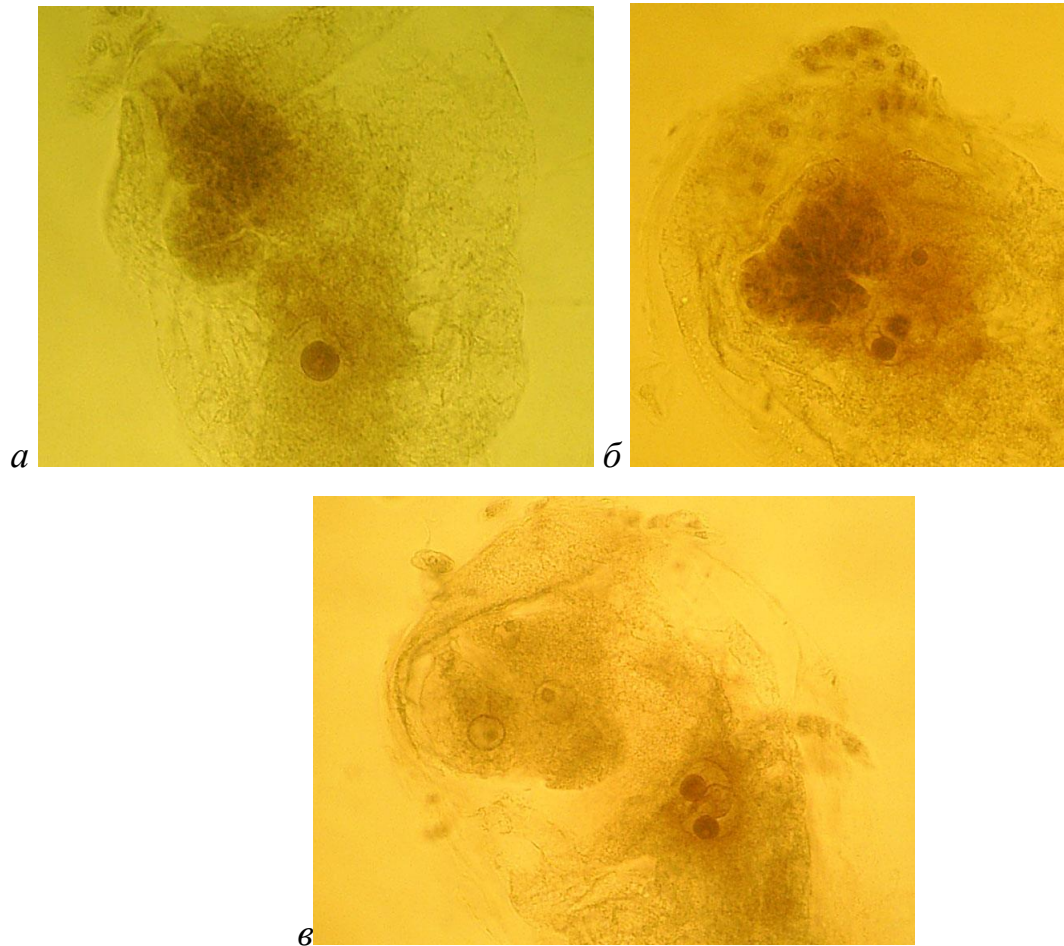


Рисунок 2 – Фрагменты зародышевых мешков кукурузы с различными аномалиями: *а* – два проэмбрио, *б* – яйцеклетка и два проэмбрио из яйцеклеткоподобных синергид, *в* – две яйцеклетки.

Из таблиц 1 и 2 видно, что спектр наиболее полный в гаметофите завязей 10-суточного возраста (как *in vivo*, так *in vitro*).

Причиной появления дополнительных яйцеклеток (полигаметия), могли быть как дополнительные деления клеток яйцевого аппарата, так и изменения направления дифференциации (Шишкинская. Юдакова, Тырнов, 2005). Такие аномалии могли служить предпосылками к появлению полиэмбрионии (Магешвари, 1954; Звержанская, 1983).

Сравнение спектра изменений в зародышевых мешках в завязях одного возраста, развивающихся *in vivo* и *in vitro*, в количественном выражении не выявило статистически значимых различий (по методу Фишера).

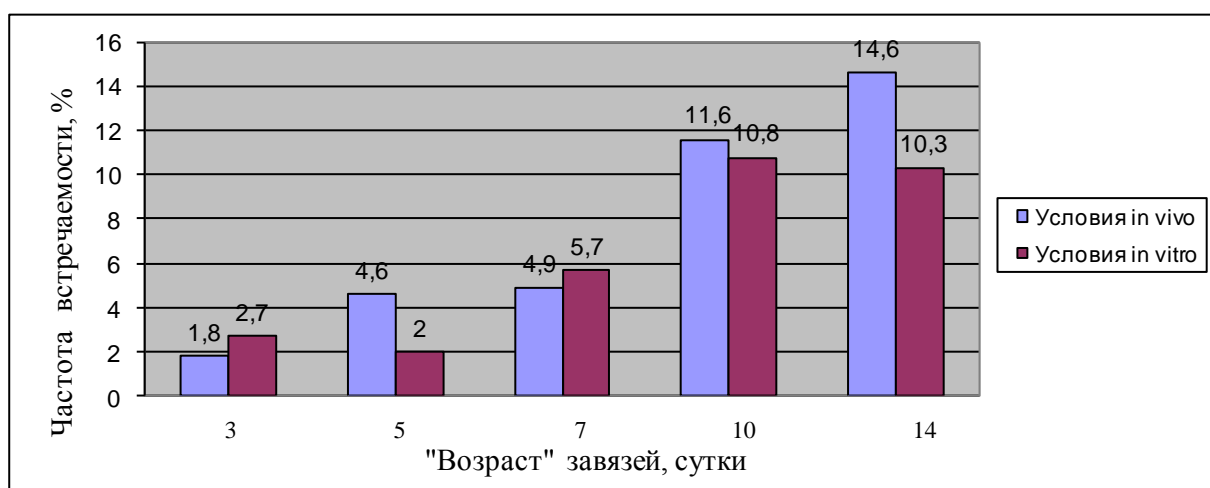


Рисунок 3 – Количество эмбриональных предпосылок к полиэмбрионии в неопылённых завязях кукурузы линии АТ-1 в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Таким образом, большинство неопылённых завязей в возрасте до 14 суток и зародышевых мешков остаются жизнеспособными.

2 Изучение путей возникновения проэмбрио в завязях без опыления

Исследование женского гаметофита неопылённых завязей 1, 3, 5, 7, 10, 14 – суточного возраста, зафиксированных до - и в процессе культивирования, позволило воссоздать динамику начальных этапов развития у кукурузы апомиктических зародышей и сделать предположение о возможных путях формирования многозародышевости у данной линии.

Установлено, что начало автономного деления яйцеклетки приходится, обычно на 8-10 сутки, реже спустя трое суток от момента появления пестичных нитей на початке материнского растения (включая период нахождения завязей на питательной среде *in vitro*).

Известно, что условия культуры *in vitro*, наличие в питательной среде фитогормонов может индуцировать деление разных элементов зародышевых мешков и стать причиной полиэмбрионии. В культивируемых нами завязях кукурузы линии АТ-1 были обнаружены деления в дополнительных яйцеклетках.

Однако пролиферативные процессы в синергидах приводили к появлению не глобулярных зародышевых структур, а образованиям каллусного типа, далее дегенерирующих. Таким образом, с большей вероятностью причиной многозародышевости у линии кукурузы АТ-1 могут быть либо независимые деления первых дочерних клеток, возникших от яйцеклетки, либо деления в дополнительных яйцеклетках.

3 Особенность развития апомиктичных зародышей *in vivo* и *in vitro*

Исследуемая линия АТ – обладает особенностями. В отсутствие оплодотворения в завязях кукурузы этой линии полноценный эндосперм не формируется. После слияния полярных ядер центральной клетки и следующих далее кариокинезов, как показано на рисунке 5, образуется лишь ценоцитная ткань.

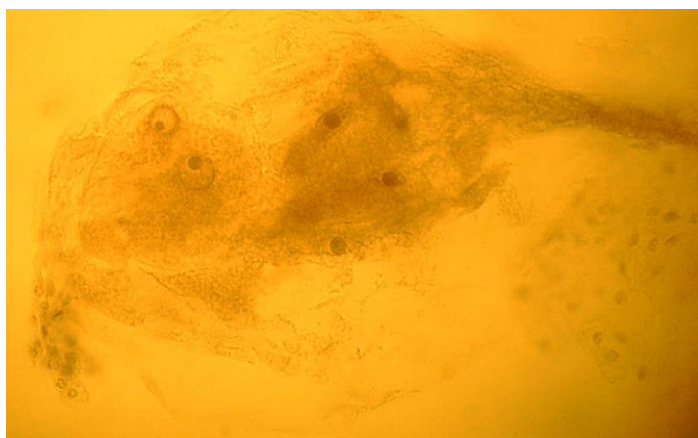


Рисунок 5 – Зародышевый мешок, включающий две яйцеклетки и 4-х ядерную центральную клетку.

Возраст завязи к этому времени уже превышает 10 суток, и в зародышевых мешках могут обнаруживаются по 1-2 многоклеточных проэмбрио, дальнейшая судьба которых зависит места их развития: *in vitro* или *in vivo*. Экспериментально доказано, что только условия культуры *in vitro*, где роль питающего фактора в отсутствии эндосперма берёт на себя искусственная среда, возможно доразвитие проэмбрио до целого растения (Alatortseva, 2001). Зародыши, возникшие автономно, без оплодотворения, но развивающиеся в завязях на материнских растениях под изоляторами, вскоре дегенерируют.

Из рисунка 6 видно, что с увеличением «возраста» завязи (задержки опыления) от 1 до 14 суток, возрастает количество обнаруживаемых в них автономно возникших зародышей, при этом в 14-суточных завязях, находящихся на питательной среде, это число несколько выше (13,1%), по сравнению завязями, развивающимися на материнских растениях (7,8%). Вероятно, это объясняется тем, что питательная среда в некоторой степени компенсирует отсутствие эндосперма.

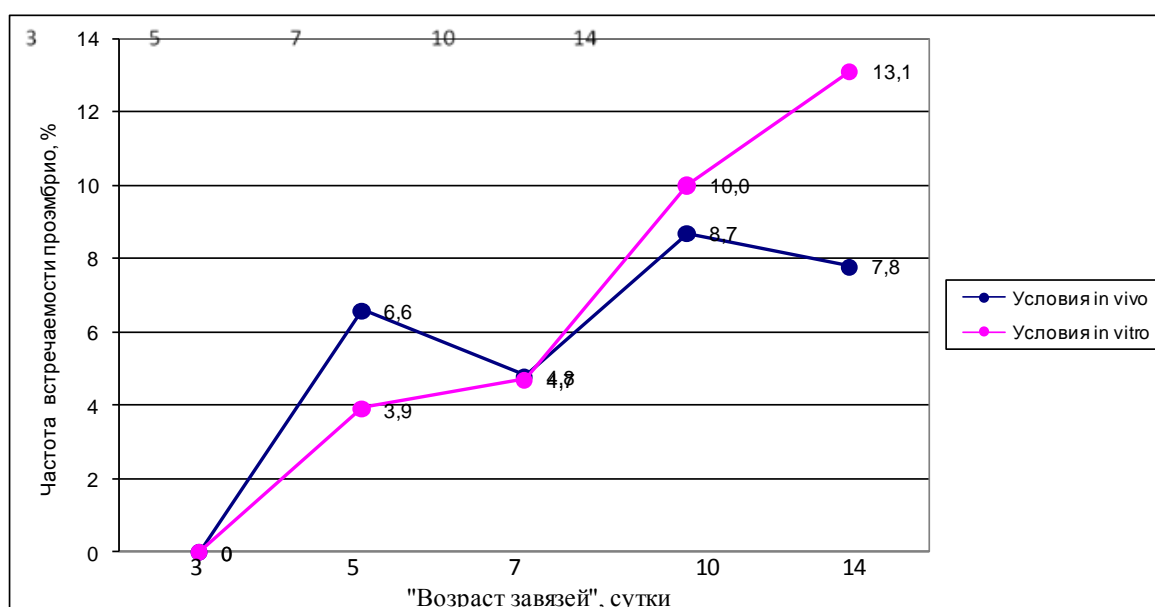


Рисунок 6 – Развитие партеногенетических проэмбрио в неопыленных завязях в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Опыление соцветий с некоторой задержкой приводит к формированию

гаплоидных зародышей на фоне триплоидного эндосперма. При нормальном опылении початков развиваются нормальные зиготические зародыши и семена.

При проращивании зиготических зерновок обнаруживаются семена, как видно на рисунке 7, с двумя, реже тремя близнецовыми проростками. Однако в течение одного сезона у этой линии кукурузы могут встречаться в смысле полиэмбрионности «продуктивные» и «непродуктивные» растения.

Например, в условиях *in vitro* в завязях только 9 растений из 30 исследованных была зафиксирована многозародышевость. Среди проросших зрелых зерновок в 13 початках из 25 были выявлены семена с двумя проростками.

В среднем частота формирования многозародышевых семян (*in vivo*) в составила 1,9% и достоверно не отличалась от частоты неопыленных завязей с несколькими проэмбрио в культуре *in vitro* (1,1%). Такая неравноценность растений кукурузы линии АТ-1, даёт возможность вести направленный отбор на получение форм с высокой частотой полиэмбрионии.

Таблица 3 – Частота встречаемости полиэмбрионии и неопылённых завязях, культивируемых *in vitro* и в зрелых зерновках кукурузы линии АТ-1.

Условия <i>in vitro</i>			Условия <i>in vitro</i>		
Номер растения (початка)	Количество завязей		Номер растения (початка)	Количество зерновок	
	общее	с полиэмбрионией, %		общее	с полиэмбрионией, %
1	329	0,9	1	240	1,7
2	317	0,7	2	273	4,0
3	327	1,2	3	289	1,0
4	330	1,8	4	318	0,9
5	309	1,6	5	241	2,9
6	318	0,7	6	248	2,4
7	310	1,3	7	273	1,5
8	305	1,5	8	289	1,0
9	299	0,3	9	318	0,9
			10	241	2,9
			11	248	2,4
			12	273	1,5
			13	250	1,2

Таким образом, сходство в развитии женского гаметофита в неопылённых завязях *in vivo* и *in vitro*, формирование в нём идентичных предпосылок к полиэмбрионии, является результатом склонности данной линии кукурузы к апомиктичному способу размножения, тенденция к которому сохраняется у изолированных завязей в условиях *in vitro* при культивировании на искусственной среде.

ВЫВОДЫ

1. Развитие женского гаметофита в неопылённых завязях кукурузы линии АТ-1 в условиях *in vitro* и *in vivo* происходит аналогично. При задержке опыления формируются идентичные предпосылки к полиэмбрионии (дополнительные яйцеклетки, яйцеклеткоподобные синергиды, дополнительные проэмбрио).
2. Наиболее полный спектр эмбриологических предпосылок к многозародышевости у апомиктической линии АТ-1 отмечается в завязях *in vitro* и *in vivo*, при задержке опыления 10 суток.
3. Причиной многозародышевости у линии кукуруза АТ-1 могут быть либо независимые деления первых дочерних клеток, возникших от яйцеклетки, либо деления в дополнительных яйцеклетках и яйцеклеткоподобных синергидах. Возникновение дополнительных зародышей из других элементов мегагаметофита не обнаружено.
4. Индуцирующее полиэмбрионию влияние условий культуры *in vitro* не выявлено. Роль питательной среды сводится лишь к компенсации отсутствующего эндосперма.
5. Доминирующим фактором, определяющим возникновение эмбриональных предпосылок к полиэмбрионии у линии кукурузы АТ- 1, является её предрасположенность к партеногенезу, которая проявляется в условиях *in vitro* и *in vivo*.

