

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

Кафедра генетики

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У
РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ РАЗНОЙ ПЛОИДНОСТИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

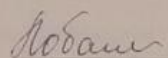
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Пахаревой Дарьи Андреевны

Научный руководитель:

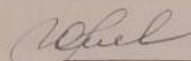
доцент каф. генетики, к.б.н.

 08.06.23 Л.П. Лобанова

подпись, дата

Зав.кафедрой генетики:

д.б.н., доцент

 08.06.23 О.И. Юдакова

подпись, дата

Саратов 2023

Введение. Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из наиболее древних и распространенных в мире зерновых культур. Именно на кукурузе были проведены широкие селекционно-генетические работы, позволившие открыть принципиально новые методы в практической селекции: создание инцухт-линий, построение сложных гибринологических схем и создание на этой основе высокоурожайных сортов. Благодаря теоретическим исследованиям кукурузы, выявлена прямая связь между цитогенетическими наблюдениями и генетическими проявлениями в потомстве.

Значение кукурузы трудно переоценить, и есть основание полагать, что вид *Zea mays* L. обладает большими потенциальными возможностями, как в увеличении урожайности, так и в расширении сферы применения самой культуры – пищевого, кормового, технического и других типов потребления. Одним из важных направлений в селекции кукурузы является экспериментальное получение полиплоидных форм.

Важность изучения развития и строения генеративных структур у полиплоидных растений обусловлена рядом причин. Во-первых, такие исследования позволяют выявить цитоэмбриологическую причину мужской и женской стерильности полиплоидов. Во-вторых, определить зависимость развития гаметофитов от числа наборов хромосом.

Исследования генеративных признаков триплоидной и тетраплоидной кукурузы на протяжении нескольких лет проводятся на кафедре генетики СГУ. Исследование качества пыльцы полиплоидов выявило достаточно широкий спектр отклонений в ее структуре по сравнению с контрольными диплоидными линиями. Среди них были выявлены пыльцевые зерна аномальной формы, не описанные ранее у кукурузы, что позволяет предположить их специфичность для изучаемых тетраплоидных форм. 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 форм кукурузы.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния уровня

плоидности на микроспорогенез диплоидных, триплоидных и тетраплоидных растений кукурузы.

В задачи исследования входило:

- 1) изучение мейоза и тетрадогенеза у диплоидной кукурузы;
- 2) изучение особенностей мейоза и тетрадогенеза у полиплоидных растений;
- 3) выявление и описание микроспороцитов атипичной формы.

Структура и объем работы. Работа изложена на 48 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащих 44 наименования.

Научная новизна и значимость работы. Проведено исследование микроспорогенеза у кукурузы разной плоидности. Впервые выявлены и описаны возможные причины формирования аномальных микроспороцитов и спорад во время мейоза. Данные о формировании подобных структур в литературе отсутствуют.

Основное содержание работы. В обзоре литературы приведены: описание процесса мейоза, его ультраструктура и цитохимия, также подробно описан процесс микроспорогенеза у диплоидных, триплоидных и тетраплоидных растений кукурузы, описаны аномалии при микроспорогенезе и тетрагенезе у полиплоидных растений.

Объектом исследования послужили диплоидные, триплоидные и тетраплоидные растения линии КрП-1 кукурузы (*Zea mays* L.). Тетраплоидная форма КрП-1 была получена в Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства и, затем, в течение ряда лет подвергалась отбору на повышение фертильности и скороспелости. Триплоидные растения регулярно появляются в семенном потомстве тетраплоидных форм кукурузы и являются распространенной примесью при их выращивании. Диплоидная

линия КМС, характеризующаяся высокой стабильностью проявления признаков, была использована в качестве контроля.

Материалом исследования послужили микроспороциты и тетрады микроспор кукурузы разной ploидности. Микроспорогенез и тетрадогенез был проанализирован у 13 растений: 6 тетраплоидных, 4 триплоидных и 3 диплоидных.

Пыльники растений на стадии мейоза фиксировали ацетоалкоголем (1:3). Для этого использовали метелки, еще не вышедшие из трубки. С каждого растения анализировалась выборка микроспороцитов, которая варьировала от 270 до 420. Для приготовления каждого препарата брали пыльники на стадии мейоза из 2 – 3 цветков изучаемого растения, и поэтому на одном препарате наблюдались разные стадии делений. Объем выборки зависел от количества микроспороцитов на нужной стадии.

Анализ микроспорогенеза проводили на временных препаратах, приготовленных по стандартной методике, которая включала следующие этапы:

1. Пыльца из фиксатора пипеткой переносилась на предметное стекло в каплю смеси ацетокармина и глицерина (1:1).
2. Препарат накрывался покровным стеклом и анализировался.
3. При необходимости можно было провести осветление препарата 45% уксусной кислотой, которую пипеткой подводили под покровное стекло.

Приготовленные таким образом препараты могли храниться в течение нескольких дней. Анализ препаратов проводился на микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×40 либо 10×63. Фотографирование проводили при тех же увеличениях на микроскопе «Axiostar-plus» (Zeiss) с помощью цифрового фотоаппарата «Canon AC» и программы визуализации «Zoombrowser».

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

Основное содержание работы. У диплоидной линии кукурузы микроспорогенез изучался у трех растений линии КМС. Для приготовления каждого препарата брали пыльники на стадии мейоза из 2-5 цветков изучаемого

растения, и поэтому на одном препарате наблюдались разные стадии делений.

Всего было проанализировано около 900 микроспороцитов, находящихся на различных стадиях мейоза и сформировавшихся спорад.

Таблица 1 – Микроспорогенез у диплоидной линии кукурузы КМС

№ растения	Число проанализированных структур	Количество проанализированных микроспор (%) на стадиях:								Тетрады
		мейоза I				диады	Мейоза II			
		профаза I	М I	А I	Т I		М II	А II	Т II	
1	325	10,7	1,6	6,76	17,2	32,0	0,0	0,0	0,7	31,0
2	270	20,4	0,0	0,7	4,3	27,3	0,4	1,1	5,6	36,6
3	286	39,5	2,2	3,0	10,8	19,7	0,2	0,2	0,7	23,5

Аномалии расхождения хромосом в мейозе, а также нарушения при заложении клеточных перегородок у диплоидной линии не были зарегистрированы. Подтверждением отсутствия нарушений в микроспорогенезе служит отсутствие аномальных продуктов мейоза – спорад аномального строения. В норме результатом мужского мейоза у кукурузы является группа из четырех спор, образующих изобилатеральную тетраду. У диплоидных растений линий КМС мужские мейотические продукты были представлены исключительно нормальными тетрадами.

В ходе изучения микроспорогенеза полиплоидных растений было проанализировано 1466 микроспороцитов и спорад у триплоидных растений и 2167 – тетраплоидных. Как и у диплоидной линии, у полиплоидов доминировали стадии профазы, диады и сформировавшихся спорад (таблица 2, 3). В обоих вариантах были обнаружены все стадии мейотического деления. В основном мейоз протекал типично, отклонения встречались редко.

Таблица 2 – Микроспорогенез у триплоидных растений кукурузы

Стадии развития	Количество проанализированных микроспороцитов (%) у отдельных растений			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Всего проанализировано	322	387	333	424
Профаза I	7,4	18,2	8,1	3,1
Метафаза I	0,9	1,5	1,5	0,2
Анафаза I	0,6	3,6	0,6	0,2
Телофаза I	1,2	1,3	1,2	2,1
Диада	27,1	25,9	15,6	39,8
Метафаза II	0,9	3,1	3,3	6,8
Анафаза II	1,5	0,8	2,4	3,5
Телофаза II	0,3	4,1	2,1	5,6
Тетрада	48,2	38,8	61,3	37,9
Спорады аномальные	11,9	2,7	3,9	0,8

Таблица 3 – Микроспорогенез у тетраплоидной линии кукурузы

КрП -1

Стадии развития	Количество проанализированных микроспороцитов (%) у отдельных растений					
	431	515	523	558	561	562
Всего проанализировано	410	398	325	286	391	287
Профаза I	23,6	15,7	46,4	26,9	31,7	41,1
Метафаза I	0,0	0,3	3,4	0,0	0,0	6,2
Анафаза I	0,0	0,8	1,2	0,7	0,0	3,1
Телофаза I	0,0	7,0	16,6	2,8	1,7	4,1
Диада	15,6	11,3	19,3	39,8	39,8	6,9
Метафаза II	0,0	1,0	0,6	0,0	2,5	4,8
Анафаза II	0,0	0,3	0,3	0,0	0,5	9,7
Телофаза II	0,0	1,8	2,5	0,7	7,1	3,4
Тетрада	51,2	51,2	4,9	23,7	34,7	18,1
Тетрады с аномальным расположением клеток	0,24	5,6	0,0	0,0	0,0	3,8
Спорады с измененным числом клеток	6,9	4,0	6,9	4,1	0,0	0,0
Атипичная форма микроспороцитов и микроспор	2,4	1,7	4,3	1,04	0,0	7,2

Важной особенностью микроспорогенеза у тетраплоидных растений было развитие микроспороцитов атипичной формы. Они были обнаружены у 5 из 6 проанализированных растений. В нашей работе они были обнаружены начиная со стадии профазы I. В этом случае вместо округлых клеток формировались более крупные и удлиненные клетки (рисунок 1 *а, б*). Ядро располагалось в расширенной части микроспороцита, и его дальнейшее деление обычно проходило нормально. Частота микроспороцитов аномальной формы на стадии профазы I варьировало от 0 (растение № 561) до 6,2 % (растение № 562). 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 карио- и цитокинеза в микроспорогенезе.



а, б – профазы I; *в* – диада; *г* – триада; *д, е, ж* – тетрады ; *з* – пентада

Рисунок 1 – Атипичная форма микроспороцитов и микроспор в спорадах у тетраплоидных растений. Увеличение $\times 400$

Соотношение микроспороцитов и микроспор в спорадах аномальной формы представлено на рисунке 2.

Частота спор, содержащих микроспору аномальной формы, у разных тетраплоидных растений линии КрП-1 варьировала от 0 до 1,7 %. Наиболее часто такие микроспоры встречались в тетрадах. Во всех обнаруженных тетрадах только одна микроспора имела атипично удлиненную форму, причем форма самих тетрад могла быть разной: линейной, изобилатеральной, т-образной и другой (рисунок 1 д-ж). Число ядер в аномальных клетках могло увеличиться до двух.



Рисунок 2 - Соотношение микроспороцитов и спор с микроспорой аномальной формы у тетраплоидных растений кукурузы

В наших исследованиях были обнаружены также единичные микроспороциты атипичной формы у триплоидных растений. Поскольку эти растения были получены при скрещивании тетраплоидной линии КрП-1 с диплоидной линией, то передача этого признака триплоидному потомству свидетельствует о его генетической обусловленности.

Микроспороциты и микроспоры атипичной формы у диплоидной линии КМС не обнаружены.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют, что аномалии мейоза у исследованных полиплоидных форм представлены тремя основными типами: нарушениями кариокинеза, цитокинеза и формированием микроспороцитов атипичной формы. У диплоидных растений нарушений в микроспорогенезе не выявлено. В работе показана сопоставимость числа нарушений, зарегистрированных в сформировавшихся продуктах мейоза у триплоидов и тетраплоидов. Специфичность нарушений в этих вариантах выражается в том, что у триплоидов доминируют триады микроспор, а у тетраплоидов – полиады. Это свидетельствует, что при формировании аномальных спор в ходе мейоза работают различные цитологические механизмы, нарушающие ход их развития. Несомненно, отклонения в мейозе полиплоидных растений обусловлены влиянием дополнительного генетического материала и определенным хромосомным дисбалансом, но изменения формы микроспороцитов могут указывать и на проявление в мейозе специфической мутации.

На основе полученных структурных характеристик мейоза и спор микроспор можно оценить потенциальную генотипическую, морфологическую и функциональную гетерогенность пыльцы. Многие обнаруженные нарушения могут быть причиной частичной стерильности пыльцы или привести к образованию нередуцированных и анеуплоидных гамет. Однако высокий процент образования типичных микроспор свидетельствует о высокой фертильности исследованных триплоидных и тетраплоидных растений. Полученные результаты также указывают на возможность использования тетраплоида КрП-1 в селекции в качестве донора диплоидных гамет.

ВЫВОДЫ

1. Микроспороциты с нарушениями кариокинеза или цитокинеза у диплоидных растений не зарегистрированы, что подтверждается отсутствием в этом варианте аномальных продуктов мейоза на стадии тетрад.
2. У триплоидных и тетраплоидных растений аномалии в мейозе

представлены отставанием хромосом, асинхронным делением клеток диады, частичным или полным подавлением цитокинеза после первого или второго деления мейоза.

3. Различные вариации карио- и цитокинеза у полиплоидных растений привели к образованию различных типов атипичных спорад: триад, аномальных тетрад, пентад, гексад и гептад. Их появление свидетельствует о возможности образования у полиплоидных растений нередуцированных и анеуплоидных пыльцевых зерен.

4. В тетрадах с морфологическими отклонениями наблюдаются изменения положения микроспор с изобилатерального на линейное, т-образное, промежуточное, а также образование неравных по размеру клеток, иногда с дополнительными ядрами.

5. Микроспороциты и микроспоры атипичной формы встречаются у тетраплоидных растений со средней частотой около 3 %. Их появление зарегистрировано на всех стадиях микроспорогенеза: от стадии профазы I до стадии тетрад. У триплоидных растений такие клетки единичны. Зарегистрированные у полиплоидов микроспороциты и микроспоры аномальной вытянутой формы могут быть потенциальной причиной образования пыльцевых зерен атипичной формы.

6. Образование 88 % типичных тетрад микроспор свидетельствуют о возможности использования данной линии кукурузы в селекции в качестве доноров диплоидных гамет и, в меньшей степени, полиплоидных и анеуплоидных гамет.

