

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

Кафедра генетики

**ХАРАКТЕРИСТИКА МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА У
ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы


Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Теккозян Кристины Рубеновны

Научный руководитель:


доцент каф. генетики, к.б.н.

 08.06.23г. Л. П. Лобанова

подпись, дата

Зав.кафедрой генетики:

д.б.н., доцент

 08.06.23г. О. И. Юдакова

подпись, дата

Саратов 2023

Введение. Явление полиплоидии представляет интерес в связи с тем, что оно может выступать одновременно и как генетический метод, используемый для получения нового селекционного материала, и как генетическое явление – своеобразный тип мутаций генома.

Увеличение числа хромосом изменяет выраженность и характер наследования признаков, пластичность формы и ее адаптационные возможности. В практической селекции полиплоидные растения нередко используются для создания полиплоидных сортов и гибридов, превышающих диплоидные аналоги по продуктивности и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды.

Экспериментальное создание высокопродуктивных тетраплоидных форм – одно из важнейших направлений в современной селекции кукурузы. Решающее значение в такой работе имеет выбор исходных тетраплоидных линий, который проводится на основе их морфобиологических и цитоэмбриологических характеристик. Оценка репродуктивного потенциала полиплоидных растений обязательно включает пыльцевой анализ, как наиболее доступный и информативный метод. Данный анализ позволяет определить репродуктивный потенциал растений по характерным особенностям пыльцевых зёрен: клеточному строению, размеру, рисунку экзины, их фертильности и жизнеспособности. Все эти характеристики очень важны при проведении селекционных работ с целью получения продуктивного потомства.

Из всего вышесказанного следует, что работы по оценке генеративных признаков, в том числе и качества пыльцы, у тетраплоидных форм кукурузы, проводимые на кафедре генетике Саратовского университета, являются весьма перспективными.

Актуальность изучения развития и строения пыльцевых зерен у полиплоидных растений обусловлена рядом факторов. Во-первых, такие исследования позволяют выявить цитоэмбриологическую причину возможной мужской стерильности полиплоидов. Во-вторых, определить зависимость развития гаметофита от числа наборов хромосом. В-третьих, знание структуры

и функции пыльцы является основой для селекционного отбора по цитогенетическим признакам экспериментально созданных тетраплоидных растений.

Целью данной работы являлось исследование строения и морфометрических характеристик пыльцы у двух тетраплоидных линий кукурузы КрП-1 и Черная Тетра.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить степень дегенерации пыльцы;
2. Изучить строения пыльцевых зерен;
3. Определить степень изменчивости размеров выполненных пыльцевых зерен.

Структура и объем работы. Работа изложена на 52 страницах машинописного текста и включает 7 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, обсуждение результатов, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 59 наименований.

Научная новизна и значимость работы. Проведенный пыльцевой анализ позволил определить репродуктивный потенциал двух тетраплоидных линий кукурузы, что служит основой для селекционного отбора по цитогенетическим признакам данных тетраплоидов. Впервые проведено цитозембриологические исследования мужской генеративной сферы тетраплоидных растений линии ЧТ.

Основное содержание работы. В обзоре литературы поэтапно рассматривается процесс формирования мужского гаметофита злаков. Подробно описывается строение пыльцевых зерен кукурузы, а также влияние полиплоидии на развитие пыльцы.

В качестве объекта исследования использовалась зрелая пыльца двух тетраплоидных форм кукурузы краснодарской селекции: КрП-1 (Краснодарская популяция 1) и ЧТ (Черная Тетра). Качество пыльцы тетраплоидов оценивалось в сравнении с пыльцой диплоидных линий: ГПЛ (создана на кафедре генетики

СГУ) и Кр-440 (получена в г. Краснодаре).

Свежесобранную пыльцу фиксировали ацетоалкоголем (1:3). Анализ зрелой пыльцы проводился по растениям. В разных вариантах использовалась пыльца с 3-5 растений.

Анализ степени дегенерации пыльцы проводился на временных препаратах, приготовленных с использованием ацетокармина и глицерина в пропорциях 1:1. Для этого пыльцу из фиксатора пипеткой переносили на предметное стекло в каплю ацетокармина с глицерином и препаровальной иглой перемешивали. Каплю закрывали покровным стеклом и анализировали в нескольких полях зрения, расположенных в верхней, средней и нижней частях стекла. На разных растениях анализировалось от 400 до 865 ПЗ.

По степени плазмолиза все ПЗ были разделены на три группы:

- а) выполненные хорошо окрашенные ПЗ;
- б) ПЗ с признаками плазмолиза;
- в) пустые ПЗ.

К «условно фертильным» были отнесены выполненные и хорошо окрашенные ПЗ. Пыльца двух остальных групп считалась дефектной и стерильной.

Анализ пыльцы на степень дегенерации, проводился у десяти растений линии Черная Тетра и восьми растений линии КрП-1 тетраплоидной кукурузы. Подсчет количества дегенерирующих пыльцевых зерен осуществлялся на микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×10 или 10×40 по диагонали препарата.

При определении степени дегенерации пыльцы у тетраплоидных линий были выделены два основных класса: выполненные (нормальные) и дегенерирующие. К дегенерирующему классу относились плазмолизованные и пустые ПЗ.

В результате данного анализа, было выявлено, что максимальная суммарная частота дегенерирующих ПЗ у растений тетраплоидных линий КрП-1 и Черная Тетра составила около 7,3 %. (рисунок 1)

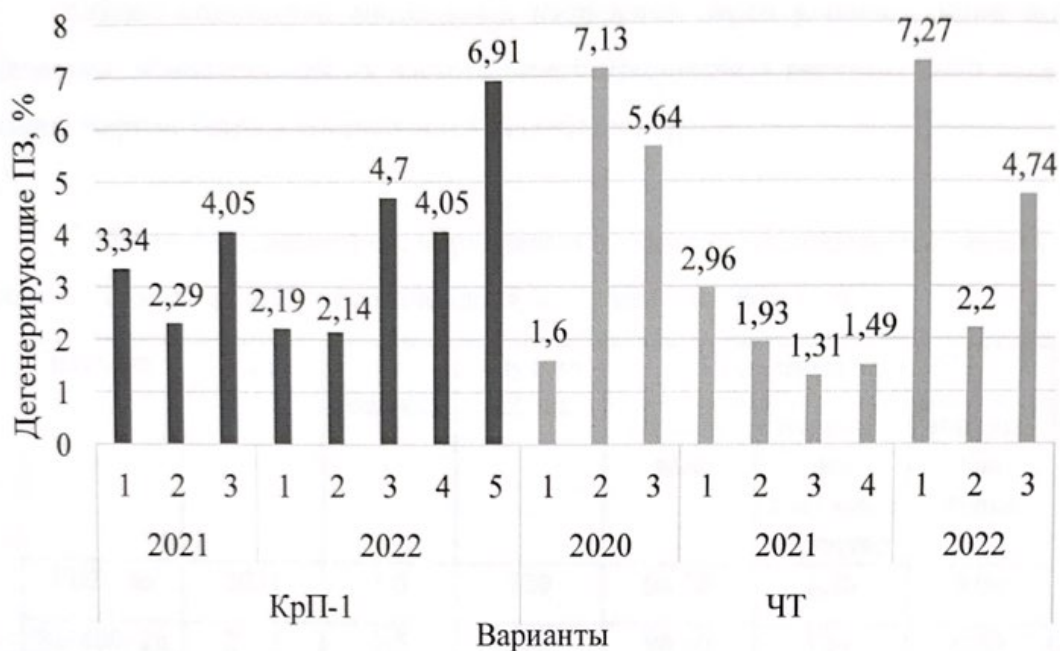


Рисунок 1 – Частота дегенерирующих пыльцевых зерен

Таким образом, основываясь на результатах исследования, можно сделать вывод, что невысокая степень дегенерации пыльцы свидетельствует о достаточно высокой пыльцевой фертильности данных тетраплоидов.

Анализ морфологии ПЗ был проведен у одиннадцати растений линии Тетра Черная и восьми растений линии КрП-1 тетраплоидной кукурузы. Количество проанализированных ПЗ у разных растений варьировал от 300 до 500. Анализ препаратов проводился на микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×40 либо 10×63. Фотографирование проводилось при тех же увеличениях на микроскопе «Axiostar-plus» с помощью программы визуализации «Zoombrowser».

Пыльца аномального строения была представлена двумя основными типами:

- изменением числа клеточных структур;
- изменением формы пыльцевого зерна.

Общее количество аномальных пыльцевых зерен у обеих линий была невелика. Максимальная их частота зарегистрирована у растения 2020 года, у линии Черная Тетра и составила 6,4 % (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание нормальных и аномальных пыльцевых зерен у растений диплоидной и тетраплоидной кукурузы в разные годы

Вариант	Год	№ растения	Изучено ПЗ, шт.	Пыльцевые зерна, %		
				нормальные	аномальное клеточное строение	аномальная форма
ГПЛ, 2n	2021	1-5	520	98,20	1,80	0,00
Кр-400, 2n	2021	1-5	500	98,50	1,50	0,00
КрП-1, 4n	2021	1-3	1123	94,37	3,38	2,25
	2022	1-5	2094	97,62	0,95	1,43
ЧТ, 4n	2020	1-4	1562	93,57	5,61	0,82
	2021	1-4	1411	95,19	2,89	1,90
	2022	1-3	1059	94,31	4,64	1,05

Анализ клеточной организации пыльцы показал, что нарушения строения ПЗ обусловлено либо остановкой развития на ранних стадиях, либо дополнительными делениями в гаметогенезе.

У диплоидных линий аномальная пыльца была представлена в основном одно- и двухъядерными ПЗ. Реже встречалась пыльца с двумя вегетативными ядрами и двумя спермиями, что указывает на наличие дополнительных митозов при развитии мужского гаметофита.

Пыльцевые зерна с незавершенным развитием (одно- и двухъядерные) были обнаружены также во всех тетраплоидных вариантах (таблица 2). Данные нарушения могли быть получены в результате полного или частичного подавления митотических делений в микрогаметогенезе, а также остановкой развития на ранних стадиях.

Таблица 2 - Соотношение разных типов пыльцевых зерен с аномальным клеточным строением у двух тетраплоидных форм кукурузы

Вари-ант, год	№ рас-те-ния	Количество ПЗ, %								
		ано-маль-ных ПЗ	1 ядер-ных	2-ядер-ных с 2ВЯ	1ВЯ + 1-2 СП + фрагмен-ты хро-матина	2ВЯ + 2СП	1ВЯ + 3СП	с 3-6 ВЯ	с 3 -4 ВЯ + 1-2 СП	Другое
ГПЛ, 2n	1-5	1,80	1,00	0,40	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00
Кр-400, 2n	1-5	1,50	1,10	0,30	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
КРП-1, 2021	1	1,77	0,00	0,50	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	4,34	1,00	1,66	0,33	0,66	0,33	0,00	0,33	0,00
	3	4,04	0,24	0,00	0,00	3,56	0,24	0,00	0,48	0,00
КРП-1, 2022, 4n	1	0,77	0,00	0,00	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,70	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,78	0,19	0,19	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	1,89	0,47	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00	0,71	0,00
	5	0,60	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00
ЧТ, 2020, 4n	1	4,63	0,00	0,00	2,93	0,00	0,00	0,00	0,00	1,73
	2	8,75	0,00	0,00	4,49	3,21	0,00	0,21	0,00	0,85
	3	2,93	0,27	0,29	0,00	1,76	0,00	0,00	0,00	0,59
	4	5,84	0,00	0,00	2,33	1,46	0,00	0,00	0,58	1,16
ЧТ, 2021, 4n	1	4,77	0,50	0,00	0,00	2,26	0,00	0,00	0,50	1,00
	2	3,70	0,53	1,06	0,00	1,59	0,00	0,26	0,00	0,26
	3	1,14	0,30	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	1,06	0,00	0,00	0,00	1,63	0,00	0,00	0,00	0,33
ЧТ, 2022, 4n	1	2,10	0,26	0,00	0,26	1,05	0,00	0,00	0,52	0,26
	2	5,99	0,90	0,00	0,00	2,60	0,00	0,00	1,20	0,30
	3	5,82	0,58	0,58	0,00	3,49	0,00	0,00	0,58	0,58

Среди выполненной пыльцы с повышенной частотой встречались ПЗ с большим количеством дополнительных ядер вегетативного типа. Такие пыльцевые зерна могли включать 3-6 ядер вегетативного типа без спермиев. Образование в ПЗ трех ядер вегетативного типа свидетельствует о том, что даже при наличии двух митозов в ходе развития пыльцы возможно нарушение клеточной дифференцировки как после первого, так и второго митоза. Это приводит к образованию пыльцы без спермиев.

Другие ПЗ содержали 2, 3 или 4 ядра и два спермия. Пыльцевые зерна с дополнительными спермиями обнаружены только у КрП-1 (2021г.) с частотой 0,33 и 0,24 %. Они содержали одно вегетативное ядро и 3 спермия.

Наличие пыльцы с дополнительными клеточными элементами указывает на возможность дополнительных митотических делений ядер в ходе развития пыльцы. Наличие в пыльце четного и нечетного числа ядер свидетельствует также на возможность синхронных и асинхронных митозов.

Встречалась, также, пыльца с дополнительными микроядрами. Такие ПЗ могли быть получены в результате ошибочных расхождений хромосом в ходе митотических делений в микрогаметогенезе.

Трехклеточные ПЗ аномального строения у тетраплоидов содержали вегетативное ядро и два спермия нетипичной формы. Спермии по внешнему виду четко отличались от нормальных. Спермии могли быть длинными (примерно в 2 раза длиннее, чем среднестатистические), изогнутыми, фрагментированными. Данные нарушения могут свидетельствовать об изменении ploidy и функциональной разнокачественности пыльцы. Вероятно, такие ПЗ образовались в результате различных нарушений во втором митотическом делении во время гаметогенеза.

Образование пыльцы с измененным клеточным строением, обусловлено различными нарушениями в микрогаметогенезе и способствует увеличению ее стерильности. Однако полиспермия и другие преобразования в спермиогенезе могут быть причиной хромосомной гетерогенности гамет и найти применение в селекционных работах.

Также, стоит отметить, что у всех тетраплоидных растений были обнаружены крупные ПЗ неправильной формы (таблица 1). Среди атипичной пыльцы, встречались пыльцевые зерна овальной, каплевидной, гантелевидной, а также более сложной формы. Вероятно, такие ПЗ образовались в результате нарушений в процессе мейоза в ходе микроспорогенеза.

Подобные аномалии являются особенностью обеих тетраплоидных линий кукурузы и не обнаружены у диплоидных форм.

При анализе пыльцы у тетраплоидных растений, важным критерием являлся размер пыльцы, который в определенной степени коррелирует с плоидностью пыльцевых зерен.

Морфометрические исследования пыльцевых зерен проводились на временных препаратах, приготовление которых включало окраску пыльцы ацетокармином с добавлением глицерина в пропорциях 1:1. Измерение диаметра проводили только на выполненных пыльцевых зернах, диаметр дегенерирующих и пустых пыльцевых зерен не измерялся.

Измерение диаметра было проведено у десяти растений линии Черная Тетра и семи растений линии КрП-1 тетраплоидной кукурузы. У каждого растения измерялось не менее 100 выполненных пыльцевых зерен. В зависимости от количества пыльцы на препарате, измерялись либо все пыльцевые зерна, либо в отдельных полосках, либо в произвольно выбранных полях зрения, расположенных в верхней, средней и нижней частях стекла.

Анализ препаратов проводилось на микроскопе «Axiostar-plus» с помощью программного обеспечения «Axiovision».

У всех исследуемых растений кукурузы независимо от плоидности, размеры пыльцевых зерен варьировали в определенных пределах (рисунок 2).



Рисунок 2 – Вариирование размера пыльцевых зерен у тетраплоидных и диплоидных форм кукурузы

Суммарные вариационные кривые показывают, что тетраплоидные формы практически не различаются доминирующими классами. У всех тетраплоидов большая часть пыльцы располагается в интервале от 95 до 115 мкм. В диплоидных вариантах доминируют пыльцевые зерна меньшего размера (от 80 до 105 мкм).

Кроме того, определение достоверности различий между средними арифметическими разных вариантов показало, что зарегистрированные различия не достоверны (рисунок 3). Это свидетельствует о несущественных различиях изученных вариантов КрП-1 и ЧТ по этому признаку. Однако все тетраплоидные варианты достоверно отличаются по размеру пыльцы от диплоидной линии

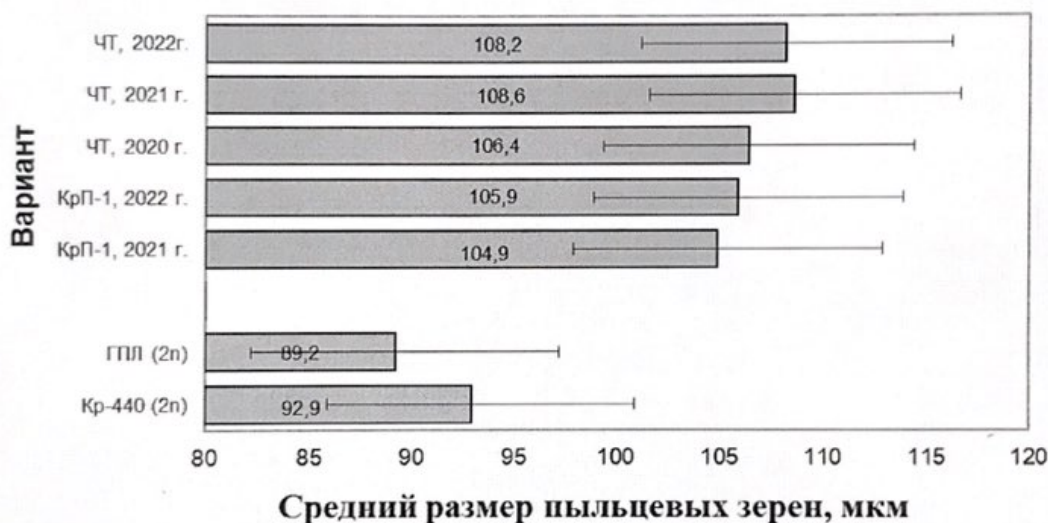


Рисунок 3 – Средний размер пыльцевых зерен у тетраплоидных и диплоидных линий

Заключение. Проведенный анализ качества пыльцы у двух тетраплоидных линий кукурузы, позволил обнаружить достаточно широкий спектр отклонений в развитии пыльцы по сравнению с диплоидными контрольными линиями.

Кроме того, у тетраплоидных растений были зарегистрированы, пыльцевые зерна атипичной формы. Причиной появления такой пыльцы могли стать нарушения цитокинеза в ходе микроспорогенеза. Данная аномалия характерна только для тетраплоидных линий и не встречается у диплоидных растений.

Зарегистрированная полиспермия и фрагментация спермиев представляет несомненный интерес для получения генетически разнообразного исходного материала. Выявленные нарушения заслуживают внимания, и эти признаки следует учитывать в селекционной работе и при изучении онтогенеза пыльцы.

Таким образом, пыльца исследованных тетраплоидных линий Крп-1 и ЧТ, характеризуется низкой частотой дегенерации и незначительной частотой образования пыльцевых зерен аномального строения. Невысокая дефектность пыльцы - результат многолетнего отбора на повышение фертильности, что, в свою очередь, свидетельствует о возможности использования данных тетраплоидов в селекции кукурузы.

ВЫВОДЫ

1. При определении степени дегенерации пыльцы у тетраплоидных линий кукурузы были выделены два основных класса пыльцевых зерен: выполненные (нормальные) и дегенерирующие. Максимальное значение дегенерирующей пыльцы у тетраплоидных растений составляло 7,3 %.

2. Частота появления пыльцевых зерен аномального строения у исследованных тетраплоидных растений не превышала 9,6 %. Аномальная пыльца была представлена двумя основными типами: изменением числа клеточных элементов и атипичной формой пыльцевых зерен.

3. Во всех тетраплоидных вариантах с определенной частотой встречались одно- и двухъядерная пыльца, и пыльца с дополнительными вегетативными ядрами и спермиями. Данные нарушения, могли быть обусловлены нарушением митотических делений и клеточной дифференцировки в ходе развития пыльцевого зерна.

4. Пыльца с 3-4 спермиями и ПЗ с измененной морфологией спермиев, могут быть причиной хромосомной гетерогенности гамет и найти применение в селекционных работах.

5. У всех растений тетраплоидных линий были зарегистрированы пыльцевые зерна атипичной формы, частота которых не превышала 3,3 %. Подобные аномалии не обнаружены у диплоидной кукурузы и, вероятно, являются следствием нарушений в микроспорогенезе.

6. Пыльца тетраплоидных линий имела более крупные размеры по сравнению с диплоидными контрольными линиями. Отсутствие достоверных различий средних размеров ПЗ у тетраплоидных растений в разные годы, свидетельствует о достаточно высокой стабильности данного признака, хотя между собой и в разные годы растения могли различаться минимальными и максимальными размерами пыльцы. Доминирующий класс при этом практически не менялся.

