

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

Кафедра генетики

**КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ У ДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ
КРАСНОДАРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направление 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Ларьковой Марины Павловны

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры генетики 9.06.2017 Лобан Л.П. Лобанова

Научный консультант

к.б.н., зав. отделом генетики

УНЦ «Ботанический сад » 9.06.2017 А.Ю. Колесова

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., профессор 9.06.2017. Юдаков О.И. Юдакова

Саратов 2017

Введение. Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из наиболее древних и распространенных в мире зерновых культур. По посевным площадям, начиная с 1999 года, кукуруза занимает первое место в мире, оттеснив пшеницу и рис. По данным МСХ РФ, Росстата, посевные площади кукурузы на зерно в России в 2016 году в хозяйствах всех категорий составили 2 893,2 тыс. га. Лидер по производству кукурузы на зерно в РФ по состоянию на 2016 год - Краснодарский край. Немаловажную роль в этом сыграло ее постоянное генетико-селекционное улучшение. В связи с этим, представляют интерес исследования, касающиеся вопросов воспроизводства кукурузы. К числу таких работ относится изучение аномалий в развитии генеративных структур, негативно влияющих на формирование семян и, следовательно, на урожайность. Причиной аномалий нередко являются гаметофитные мутации, изучение которых имеет научное и практическое значение. Такие исследования позволяют установить не только причины стерильности, но и выявить формы с наследственно обусловленной склонностью к образованию гаплоидных или тетраплоидных растений, получение которых является важнейшим направлением в селекции кукурузы.

На кафедре генетики СГУ на протяжении многих лет ведутся исследования гаметофитных мутаций у разных видов, в том числе и кукурузы. Для оценки особенностей развития генеративной сферы на кафедру генетики СГУ были переданы линии кукурузы из Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко. 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 мужского гаметофита данных линий позволит установить степень мужской фертильности данных линий и перспективу их использования в селекционных программах.

Целью данной работы явилось исследование зрелых пыльцевых зерен у растений пяти линий кукурузы краснодарской селекции.

В задачи исследования входило:

- 1) определение степени дегенерации пыльцы у растений разных линий;
- 2) изучение строения выполненных пыльцевых зерен;
- 3) определение степени изменчивости размеров выполненной пыльцы;

Объектом исследования послужили растения пяти линий кукурузы, полученные в Краснодарском НИСХ и переданные для изучения генеративной сферы под условными номерами: №2, №6, №7, №19 и №440. Выборка растений у различных линий варьировала от 3 до 5.

Материалом для исследования послужили зрелые пыльцевые зерна. Для определения СДП (степени дефектности пыльцы) смесь пыльцы из фиксатора пипеткой переносили на предметное стекло в каплю ацетокармина и препаровальной иглой перемешивали. Каплю закрывали покровным стеклом и анализировали с помощью микроскопа «Primo Star» при увеличении 10×40. Измерение диаметра ПЗ проводили с помощью программного обеспечения «Axiovision». Анализ строения ПЗ проводили на временных препаратах, приготовленных по стандартной методике, которая включала окраску ацетокармином. Статистическую обработку проводили в соответствии с общепринятыми методами и использованием программы Statistica 6.

Бакалаврская работа состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов исследования, заключения выводов и списка использованных источников.

Основное содержание работы. Качество пыльцы считается основным критерием при оценке фертильности растений и тесно связано с плодovitостью растений. У всех исследованных растений кукурузы большая часть пыльцы была выполненной, то есть имела хорошо окрашенную цитоплазму, без признаков дегенерации (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты анализа пыльцы у пяти линий кукурузы

№ линии	№ растения	Число проанализированных ПЗ, шт.	ПЗ, %	
			выполненные	пустые + плазмоллизированные
2	3	202	83,2	16,8
	4	195	72,3	27,7
	5	200	77,8	22,2
	среднее		77,8±3,1	22,2±3,1
6	1	232	97,4	2,6
	2	286	94,0	6,0
	3	253	96,0	4,0
	5	200	90,1	9,9
	6	141	98,6	1,4
	среднее		95,2±1,5	4,7±1,5
7	1	266	90,2	9,8
	2	229	98,3	1,7
	3	246	88,6	11,4
	среднее		95,4±3,0	7,6±3,0
19	4	176	99,4	0,6
	5	122	91,8	8,2
	6	99	94,9	5,1
	среднее		95,4±2,2	4,6±2,2
440	4	264	85,2	14,8
	5	238	94,5	5,5
	6	300	77,1	22,8
	среднее		85,5±5,0	14,4±5,0

Минимальное количество выполненной пыльцы обнаружено у линий № 2 и № 440 (77,8 – 85,5%). Соответственно эти линии характеризовались наибольшим количеством дегенерирующей пыльцы, и достоверно отличались по этому признаку от трех других линий и между собой (рисунок 1). У трех других линий количество пустых и дегенерирующих пыльцевых зерен невелико и составляет менее 5%. Поэтому детальному анализу были подвергнуты выполненные пыльцевые зерна без признаков дегенерации, которые могут иметь как нормальное, так и аномальное строение.

Вся выполненная пыльца была разделена на 2 группы: нормального и аномального строения. Зрелые пыльцевые зерна кукурузы нормального строения являются трехклеточными и содержат вегетативную клетку с одним ядром и два спермия.

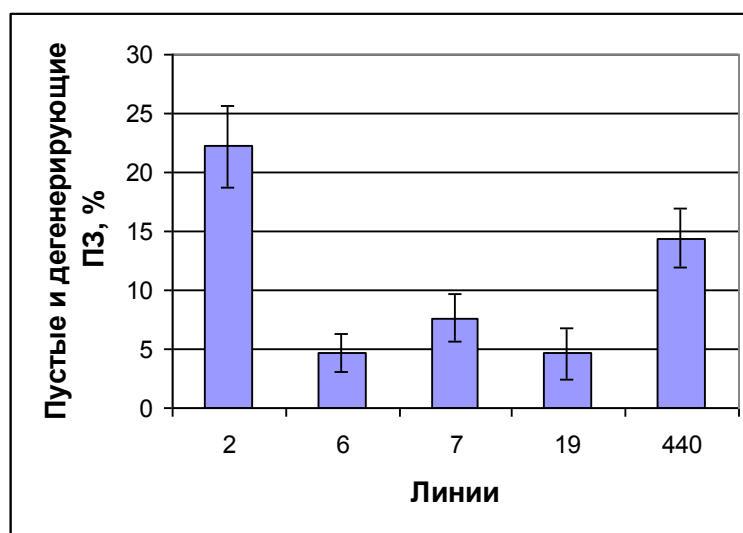


Рисунок 1 – Частота дегенерирующих и пустых пыльцевых зерен у разных линий

У всех исследованных линий преобладают пыльцевые зерна нормального строения. Наименьшее количество нормальной пыльцы содержат растения линии № 2 (73,8%). Сравнение показало, что по суммарному количеству пыльцы аномального строения у исследованных растений большинство линий достоверно отличаются между собой (рисунок 2).

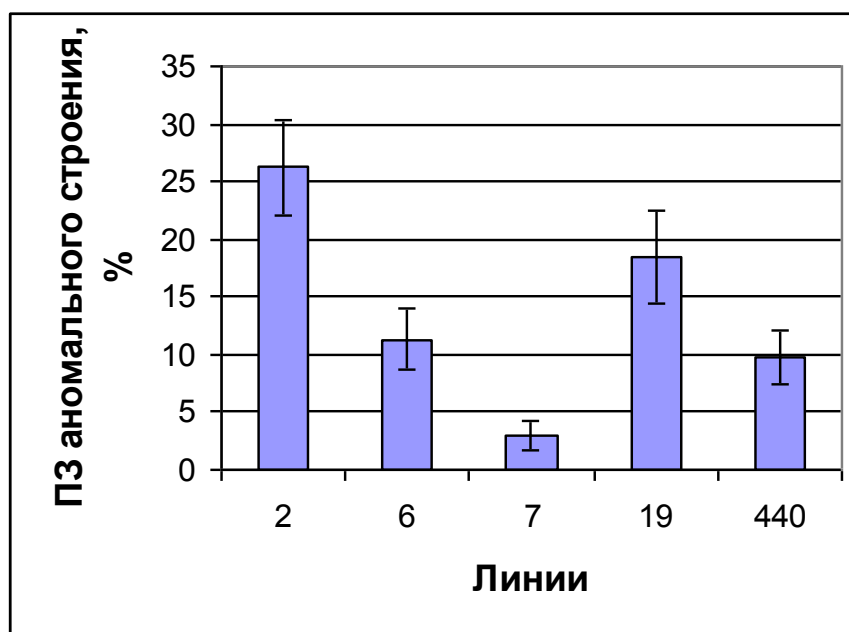


Рисунок 2 – Частота пыльцы аномального строения у линий кукурузы

Пыльца аномального строения имела меньшее или большее, чем в норме, число ядер и клеток. Вся аномальная пыльца у растений линии № 2 была представлена именно этим типом аномалий (таблица 2). Одноядерная пыльца обычно содержала достаточно крупное ядро округлой формы. Двухядерная пыльца была представлена разными морфотипами. Наиболее часто встречалась пыльца с двумя ядрами, сходными по морфологии с вегетативным ядром. Реже встречались пыльцевые зерна с вегетативным и генеративным ядрами. Большая часть пыльцы с остановкой развития была плазмолизированной и характеризовалась разной степенью дегенерации ядер и цитоплазмы.

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	0,0
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	1,3±1,0
7	1	239	98,7	1,3	0,0	0,0
	2	224	97	1,7	0,0	0,0
	3	218	94	2,4	0,0	3,6
	Среднее		96,6±1,4	1,8±0,3	0,0	1,2±1,2
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	3,2±1,1
440	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	4,2±0,9

У четырех линий (исключение составляет линия № 2) со средней частотой от 1 до 4% встречались ПЗ, содержащие более трех клеток (таблица 2). Такие ПЗ содержали дополнительные ядра вегетативного типа, спермии и микроядра. При наличии в пыльцевом зерне трех спермиев, визуальных различий по внешнему виду не обнаружено. Спермии имели примерно одинаковый размер, форму, интенсивность окраски.

У трех линий (№ 6, 19 и 440) были обнаружены ПЗ с фрагментацией ядер (таблица 2). Такие пыльцевые зерна условно были отнесены к аномальным трехклеточным, так как содержали обычно типичное вегетативное ядро, два спермия и, вероятно, фрагменты ядер спермиев. Частота встречаемости таких пыльцевых зерен была максимальной у линии 440 и составила 2,6%.

В ходе пыльцевого анализа у трех линий (№ 7, 19 и 440) были обнаружены крупные пыльцевые зерна неправильной формы. Их частота у отдельных растений варьировала от 0,3 до 3,6%.

Важным критерием при оценке качества пыльцы является ее размер, который в определенной степени коррелирует с плоидностью пыльцевых зерен. Визуальная оценка пыльцы показала, что у растений разных линий размеры пыльцевых зерен варьируют в определенных пределах. Поэтому было проведено измерение диаметра пыльцы с помощью программы визуализации «Zoombrowser».

Обнаружено, что исследованные линии достаточно четко различаются по размеру выполненной пыльцы. Пыльца у линий № 7 и 440 заметно мельче, чем у других ($x = 93$ мкм). Наиболее крупная пыльца образуется у линии № 2 ($x = 131$ мкм) (таблица 3). У разных линий диаметр пыльцы варьировал в различных пределах, о чем свидетельствуют значения ее минимальных и максимальных размеров и значениями коэффициента вариации, который характеризует степень отклонения измеренных значений от среднеарифметического. Максимальная вариабельность пыльцевых зерен по размеру обнаружена у линий № 2 и 6 ($v = 15,6\%$).

Полученные данные измерений диаметра пыльцы у разных линий были представлены в виде вариационных рядов (рисунок 3).

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
440	527	92,9±0,4	58,4	112,8	9,2

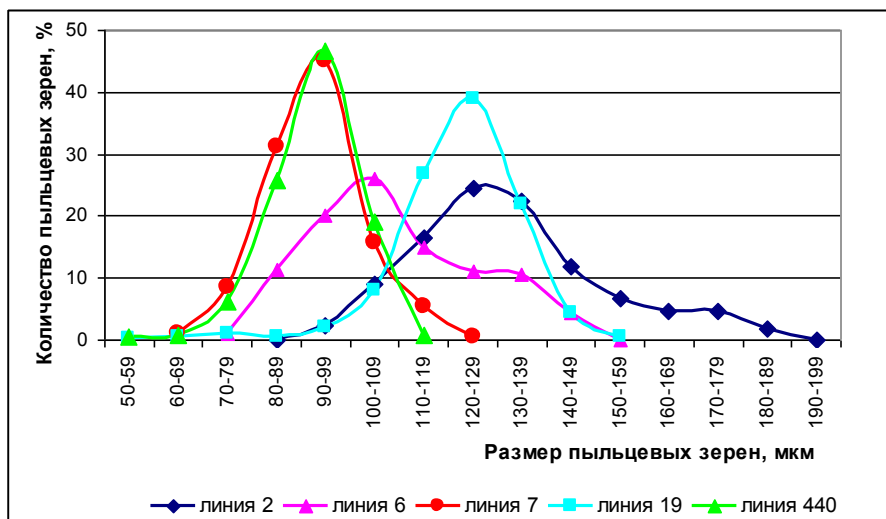


Рисунок 3 – Изменчивость диаметра пыльцевых зерен у линий кукурузы

Полученные кривые отражают изменение доминирующих классов и размах изменчивости диаметра пыльцевых зерен у разных линий. У линии № 2 доминируют более крупные пыльцевые зерна, 11% которой имеет размер от 160 до 190 мкм. Пыльца такого размера в других вариантах не зарегистрирована. У линии № 19 с частотой 1% встречаются микрзерна, диаметр которых в 2 раза меньше пыльцы среднего размера. Разница средних

арифметических по диаметру пыльцы между линиями достоверно различается, что указывает на их четкие различия по размеру пыльцы.

При проведении пыльцевого анализа важнейшим показателем является стерильность изучаемой линии. Стерильность пыльцы определяется суммой дегенерирующих пыльцевых зерен и пыльцевых зерен аномального строения. Суммарный показатель этих критериев показывает, что стерильность максимальна у линии № 2 и составляет около 50% (рисунок 4). У линий № 19 и 440 этот показатель равняется 23 и 24% соответственно.

Различия в соотношении количества дегенерирующей и аномальной пыльцы между исследованными линиями показывают, что при формировании дефектной пыльцы могут работать различные механизмы, нарушающие ход ее развития.

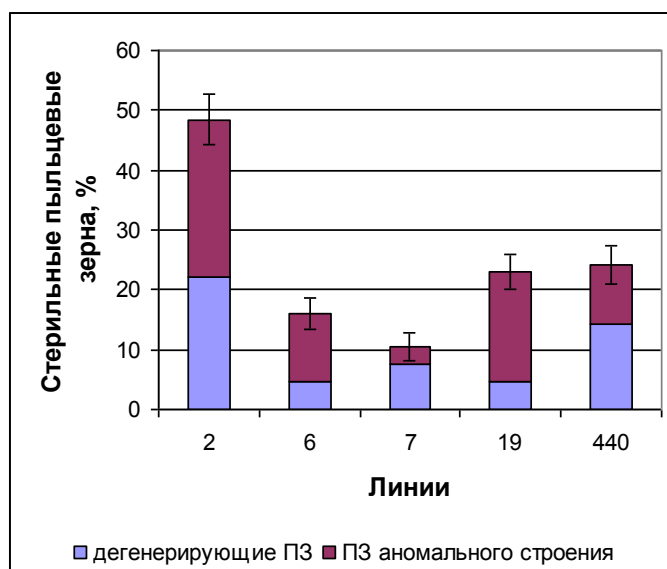


Рисунок 4 – Частота стерильных пыльцевых зерен у линий кукурузы

Закключение. Проведенное исследование качества пыльцы у пяти линий кукурузы выявило между ними четкие различия по степени дегенерации, строению выполненных пыльцевых зерен и их размеру. Наибольшее количество отклонений обнаружено у линии № 2, пыльца которой характеризуется максимальной вариабельностью по всем трем критериям. Наличие крупных пыльцевых зерен у данной линии может указывать на увеличение их плоидности. Все это свидетельствует о

значительных нарушениях, прежде всего, в ходе мейоза, причиной которых, возможно, является мейотическая мутация. Перспективными для поиска мутаций, влияющих на онтогенез пыльцы, являются также линии № 19 и 440, у которых особый интерес представляет образование пыльцы с дополнительными спермиями.

По результатам исследований были сделаны следующие выводы.

1. Пыльца трех линий кукурузы краснодарской селекции № 2, 19 и 440 характеризуется высокой степенью дефектности пыльцы (23-48%). Дефектность пыльцы у растений линий № 6 и 7 не превышает 16%.
2. Дегенерирующая пыльца характеризуется разной степенью плазмолиза и разрушения цитоплазмы и ядер. Дегенерация пыльцы максимально выражена у линии № 2 и минимально у линии № 6.
3. Частота пыльцевых зерен с различными аномалиями строения, проявляющимися в уменьшении или увеличении числа ядер, варьирует у разных линий от 3,4 до 26,2 %.
4. У четырех изученных линий выявлена пыльца с дополнительными спермиями и с фрагментацией спермиев. Полиспермия у разных линий зарегистрирована с частотой 1,3 - 4,6 %. У линии № 2 этот тип аномалий отсутствует.
5. Обнаружена морфологическая неоднородность спермиев, обусловленная их разным размером и степенью окраски ядерным красителем. Это указывает на возможность аномальных митозов и, возможно, амитозов в спермиогенезе, приводящих к разнокачественности спермиев. Наличие полиспермии может быть свидетельством изменения ploидности пыльцевого зерна.
6. Установлено, что размер пыльцевых зерен у растений изученных линий варьирует незначительно (коэффициент вариации не превышает 15,7%). Между линиями различия пыльцы по диаметру четкие и достоверные. Мелкие и крупные пыльцевые зерна встречаются у двух линий, и их присутствие указывает на возможность образования анеуплоидной или диплоидной пыльцы