

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

**ВЛИЯНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ПАРТЕНОГЕНЕЗА У
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Тугушевой Гульсини Зекерьяевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


08.06.2019г. Т.А. Алаторцева

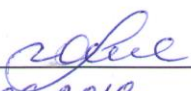
Научный консультант:

ведущий биолог лаборатории
биотехнологии

и репродуктивной биологии 
08.06.2019г. Н.В. Апанасова

Зав. кафедрой:

профессор, докт. биол. наук


08.06.2019г. О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Одним из главных аспектов практического использования апомиксиса у растений является закрепление гетерозиса у гибридов в силу отсутствия у апомиктов расщепления в последующих поколениях.

Явление апомиксиса и партеногенеза более характерно для дикорастущей флоры, у культурных растений оно встречается достаточно редко. Благоприятным для селекционеров является перевод культурных половых форм на апомиктический способ размножения. Это может привести к увеличению урожайности, однородности сортов и снижению стоимости производства гибридных семян. Одним из перспективных подходов является передача апомиксиса путем гибридизации с партеногенетическими линиями, которые могут служить донорами этого признака.

Получение новых генетически маркированных партеногенетических линий с хорошо выраженными фенотипическими признаками у растений и их семян позволит упростить передачу генов партеногенеза в другие линии, контролировать гомо- и гетерозиготность апомиктов, автономное или половое происхождение эндосперма. Представляют интерес работы по диагностике апомиксиса у таких гибридов.

В связи с этим работа, посвященная изучению влияния цитоплазмы на проявление партеногенеза у кукурузы является актуальной и практически значимой.

Цель работы:

Оценить возможность проявления партеногенеза у генетически маркированных линий с разной цитоплазмой.

Задачи исследования:

1. Изучить строение зародышевых мешков у линий кукурузы с разной цитоплазмой и выявить возможный спектр аномалий.
2. Оценить у исследуемых линий кукурузы вероятность сезонных различий в формировании зародышевых мешков с аномалиями в строении.

3. Провести сравнение частот проявления партеногенеза у линий с разной цитоплазмой.
4. Определить у исследуемых генотипических форм вероятность развития полиэмбрионных зерновок в разные годы.
5. Изучить вероятность формирования гаплоидных проростков из семян линий кукурузы с разной цитоплазмой.
6. Определить значение цитоплазмы и сезонных условий проявления гаплоидии и полиэмбрионии.

Структура и объём работы. Работа изложена на 42 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 37 наименований.

Основное содержание работы. Объектами для исследования являлись растения двух линий кукурузы с генотипами lg_1, wx, y_1 (N) и bm_2, g, y_1 (N), производные от генетически маркированной линии кукурузы АТТМ с фертильной цитоплазмой (N), а также их аналоги: lg_1, wx, y_1 (B) и bm_2, g, y_1 (B), переведенные на стерильную боливийскую цитоплазму (B), вызывающую ЦМС. Исходная линия АТТМ – результат скрещивания амфимиктической линии ТМ и линии АТ-1 с наследственной предрасположенностью к партеногенетическому развитию зародыша. Указанные у линий гены – маркерные гены линии ТМ:

lg_1 – liguleless leaf (безлигульный лист) – (2 хромосома);

wx – waxy endosperms (восковидный эндосперм) – (9 хромосома);

y_1 – yellow endosperm (желтый эндосперм) – (6 хромосома);

bm_2 – brown midrib (коричневая средняя жилка листа) – (1 хромосома);

g_1 – golden (золотистая окраска листьев и стеблей) – (10 хромосома).

Исследуемые растения выращивались на экспериментальном поле НПО "Сорго" по правилам селекционной работы (делянки 4 ряда по 15–20 растений). Для цитозэмбриологического анализа до появления рылец початки

кукурузы помещали под пергаментные изоляторы. На седьмые сутки после появления рылец початки фиксировали в ацетоалкоголе (3 части этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты). Через месяц после фиксации из початков пинцетом извлекали завязи, которые затем переводили в 70 % спирт для длительного хранения.

Для установления частоты гаплоидии и полиэмбрионии семена проращивали. Проращивание проводили в медицинских эмалированных кюветах со стеклом, обернув его фильтровальной бумагой. Семена предварительно промывали под проточной водой в течение 10 минут, затем помещали в ёмкость с раствором коммерческого средства «Белизна» (1 часть белизны: 1 часть воды) и выдерживали в течение 5 минут. Затем семена раскладывали на влажной фильтровальной бумаге и накрывали стеклом. Кюветы с зерновками помещались в теплое (25°C) светлое место. Фильтровальная бумага по мере необходимости смачивалась водой.

Первый отбор проводился на стадии coleoptila. Отбирали формы с характерными морфологическими особенностями корней (кольцевидно закрученным главным корнем, тонкими и короткими главным и придаточными корнями), второго листа (укороченный в 1,5-2 раза, клинообразной или лопаткообразной формы, расщепленный на конце, в форме паруса) или растения в целом (миниатюрные растения, растения с волнистыми и деформированными листьями), а также все формы полиэмбрионов (двоен).

Повторный анализ проводился на стадии 4 листьев и был направлен на определение гаплоидов по морфологическим признакам. Четвертый лист у гаплоидов широкий и короткий, главный корень тонкий и нередко закручивается в спираль.

Для проведения цитозембриологического анализа зародышевых мешков использовали метод ферментативной мацерации, с последующей диссекцией семязачатков.

Методика приготовления препаратов зародышевых мешков включала их окраску и вычленение из семязачатков.

1. Завязи помещались в кусочки марли и промывались в проточной воде в течение 2-3 часов.

2. Материал переносили в 4% железоаммонийные квасцы на 20 минут.

3. Промывка водой 3-4 раза

4. Окрашивание ацетокармином 24 часа при комнатной температуре.

После окрашивания завязи промывали проточной водой в течение суток, извлекали из марли и помещали в цитазу (фермент, получаемый из пищеварительного сока виноградных улиток) на 20 минут. Затем цитаза удалялась пипеткой, и завязи несколько раз промывались дистиллированной водой. После мацерации завязи хранились в воде в холодильнике в течение 1-2 суток.

Из таких завязей в капле глицерина с помощью электролитически заточенных вольфрамовых игл выделяли семязачаток, а из них — зародышевый мешок. Выделенные зародышевые мешки переносили на чистое предметное стекло в каплю глицерина и накрывали покровным стеклом.

Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей.

В ходе микроскопического анализа препаратов зародышевых мешков девяти названных линий были выявлены следующие основные типы зародышевых мешков (ЗМ): 1) нормального строения; 2) с дополнительными яйцеклетками (с двумя и тремя); 3) с партеногенетическим проэмбрио; 4) с одним центральным ядром. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Структура зародышевых мешков кукурузы линий АТТМ, гомозиготных по генам: $lg_1, wx, y_1, .bm_2, g$ и их аналогов на стерильной цитоплазме В

Генотип линий	Количество зародышевых мешков (ЗМ), %,					
	Год, №	нормального строения	с партеногенетическим проэмбрио	с 2 яйцеклетками	с 3 яйцеклетками	с одним центральным ядром
lg_1, wx, y_1 (N) *	1	94,5	0,9	0	0,9	3,6
lg_1, wx, y_1 (N)	2	95,0	2,0	0	0	3,0
lg_1, wx, y_1 (N)	3	97,0	1,0	2,0	0	0
lg_1, wx, y_1 (B) **	1	93,0	3,0	1,0	1,0	2,0
lg_1, wx, y_1 (B)	2	98,0	1,0	1,0	0	0
lg_1, wx, y_1 (B)	3	97,0	2,0	0	0	1,0
bm_2, g, y_1 (N)	1	97,2	0,7	2,1	0	0
bm_2, g, y_1 (N)	2	97,0	1,0	2,0	0	0
bm_2, g, y_1 (N)	3	94,0	3,0	1,0	0	2,0
bm_2, g, y_1 (B)	1	94,7	2,4	1,8	0	1,2
bm_2, g, y_1 (B)	2	92,0	3,0	1,0	1,0	3,0
bm_2, g, y_1 (B)	3	98,0	1,0	2,0	0	0

Примечание: * (N) – нормальная цитоплазма;

** (B) – боливийская, стерильная цитоплазма

Зародышевые мешки типичного (нормального) строения по морфологии соответствовали описанию мегагаметафитов кукурузы, данные многочисленными исследователями.

Как правило, такие мегагаметофиты по форме яйцевидно-удлиненные. Было видно, что в расширенной части (микропиллярной) расположен яйцевой аппарат, клетки которого имеют грушевидную форму. Яйцеклетка занимает центральное положение, с обеих сторон которой находятся синергиды. Ядро яйцеклетки обычно крупнее синергид. Ядра синергид, смещены к

микропилярному концу. В середине центральной клетки, непосредственно под яйцевым аппаратом, находятся два расположенных рядом полярных ядра. К суженной халазальной части центральной клетки примыкает антиподальный комплекс. Число антипод может достигать 30 и более.

В некоторых зародышевых мешках присутствовали дополнительные яйцеклетки, которые могли возникнуть в результате деления первичной яйцеклетки вследствие заложения первой перегородки при митотическом делении. В таких зародышевых мешках отчетливо были видны синергиды типичного строения.

Были обнаружены также мегагаметофиты с дополнительными яйцеклетками при полном отсутствии синергид. Вероятно, что это яйцеклеткоподобные синергиды, имеющие по расположению и строению ядер морфологическое сходство с яйцеклеткой.

Удалось также зафиксировать присутствие зародышевых мешков с одним центральным ядром – результат слияния полярных ядер.

В некоторых мегагаметофитах было отмечено присутствие партеногенетического проэмбрио с разным количеством клеток. По отсутствию следов проникновения пыльцевой трубки можно было судить об автономном развитии зародышей.

Существует мнение, что с апомиксисом и его элементами тесно связана полиэмбриония. В ходе развития женских генеративных структур у партеногенетических видов нередко создаются цитоэмбриологические предпосылки к полиэмбрионии. К их числу относятся: формирование нескольких зародышевых мешков в одном семязачатке, нескольких яйцеклеток в одном мегагаметофите (полигаметия), яйцеклеткоподобных синергид или антипод (апогаметия). Сравнительный статистический анализ показал, как видно из таблицы 1, что в полном объеме спектр подобных аномалий обнаруживается не у всех линий и не в каждом сезоне. Так, зародышевые мешки с дополнительными яйцеклетками у линии *lg1*, *wx*, *yl*

(N) с вероятностью 1,0-2,0% были отмечены в сезонах №1 и №2; у её мужски стерильного аналога, *lg1, wx, y1* (B) – в сезоны №1 и №3. В тоже время гаметофиты с двумя яйцеклетками у генотипических форм: *bm2, g, y1* (N) и *bm2, g, y1* (B) встречались во всех трех сезонах (вероятность 1,0-2,0%). Появление третьей яйцеклетки в зародышевом мешке было зарегистрировано в единичных случаях.

Более весомым доказательством склонности линий к партеногенезу является развитие в неопылённых семязачатках проэмбрио. На рисунке 1 видно, что сезонные различия в проявлении партеногенеза у апробированных линий и их аналогов индивидуальны и единой устойчивой тенденции к увеличению или снижению частоты этого явления в определённый год не отмечено.

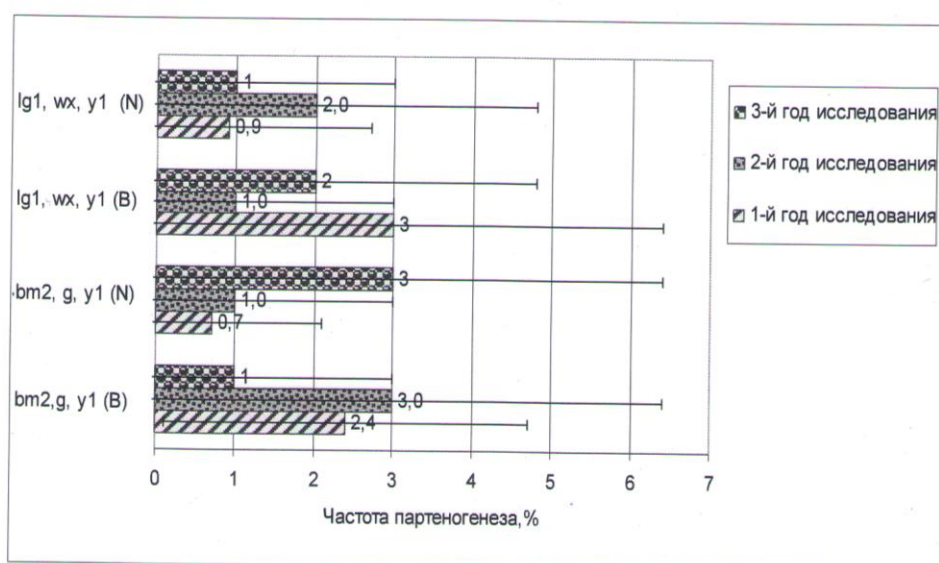


Рисунок 1 – Соотношение частот партеногенеза у генетически маркированных линий кукурузы в разные годы (сезоны) исследования

При этом визуально можно было отметить, что для форм с генами *lg1, wx, y1* (B) менее благоприятным оказался 2-й год (сезон №2) эксперимента, а сезоны №1 и №3 – более благоприятными. Тот же сезон №2 отличался высокой частотой партеногенеза для *bm2, g, y1* (B). Статистическая обработка

данных по партеногенезу у форм с разным типом цитоплазмы не выявила в них достоверных различий.

Кроме цитозэмбриологического метода для определения предрасположенности к полиэмбрионии а, следовательно, и к партеногенезу был использован метод анализа проросших зерновок. Были протестированы зерновки тех же 2 линий кукурузы и их ЦМС-аналогов.

В результате чего были установлены частоты проявления гаплоидии и близнецовости у данных генотипических форм (таблица 2).

Таблица 2 – Частота встречаемости зерновок с гаплоидными близнецовыми проростками

Генотипы	Год исследования, №	Зерновки,		
		всего	с гаплоидными проростками, %	с полиэмбрионами, %
lg ₁ , wx, y ₁ (N)*	1	791	1,1	0,1
lg ₁ , wx, y ₁ (N)	2	761	2,5	0,4
lg ₁ , wx, y ₁ (N)	3	761	3,1	0,5
lg ₁ , wx, y ₁ (B)**	1	574	1,7	0,2
lg ₁ , wx, y ₁ (B)	2	601	1,0	0,3
lg ₁ , wx, y ₁ (B)	3	396	2,6	0
bm ₂ , g, y ₁ (N)	1	470	1,3	0
bm ₂ , g, y ₁ (N)	2	1043	1,9	0,1
bm ₂ , g, y ₁ (N)	3	1141	3,1	0,3
bm ₂ ,g, y ₁ (B)	1	354	1,2	0,3
bm ₂ ,g, y ₁ (B)	2	152	0,7	0,0
bm ₂ ,g, y ₁ (B)	3	868	2,2	0,6

Примечание: * (N) – нормальная цитоплазма;

** (B) – боливийская, стерильная цитоплазма

Из таблицы 2 и рисунка 2 следует, что для всех генотипических форм сезон №1 оказался менее «урожайным» на полиэмбрионию и частота её проявления варьировала от 0 до 0,3%, более благоприятным для всех линий оказался сезон №3.

Сходная тенденция была установлена для частоты проявления гаплоидии. На рисунке 8 видно, что визуальный минимум приходится на сезон №1 – от 1,1 до 1,3%, в зависимости от линии, при максимуме в сезон №3 – от 2,1 (bm₂,g, y₁ (B) до 3,4% (lg₁, wx, y₁ (N)).

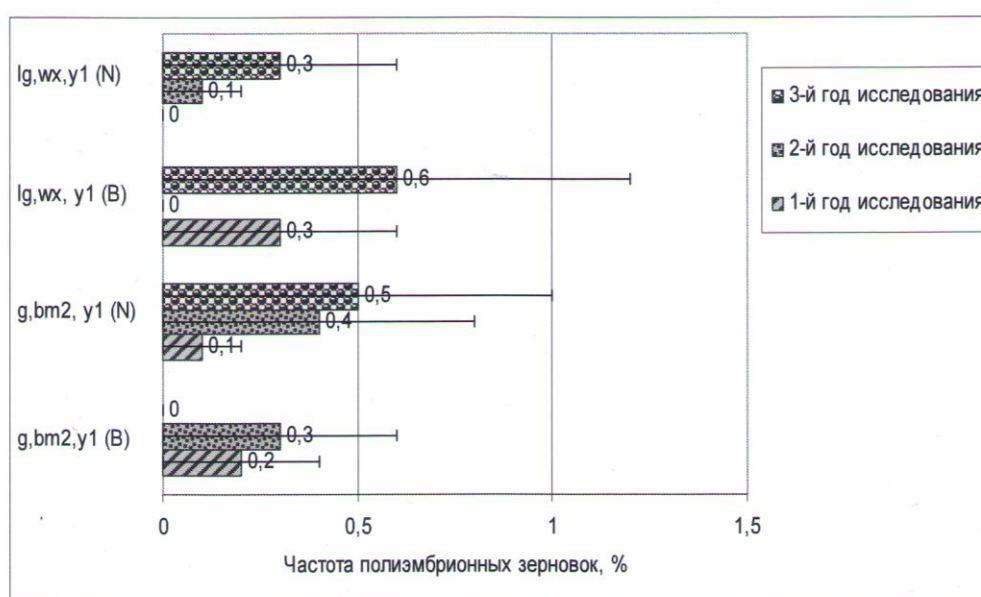


Рисунок 2 – Соотношение частот полиэмбрионии у генетически маркированных линий кукурузы в разные годы (сезоны) исследования

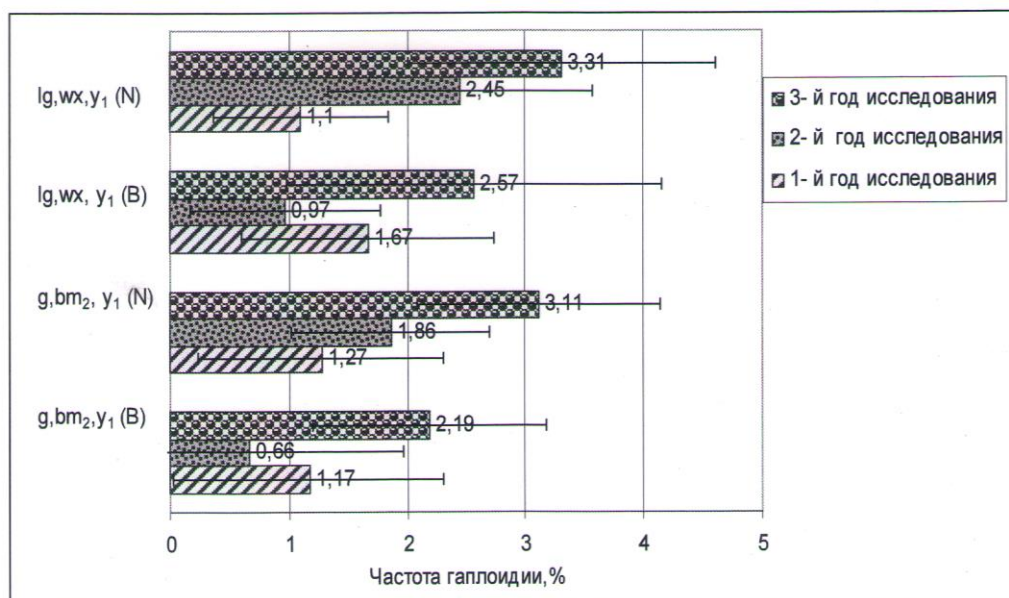


Рисунок 3 – Соотношение частот гаплоидии у генетически маркированных линий кукурузы в разные годы (сезоны) исследования

Следует также отметить, что имеют место некоторые различия в частоте появления гаплоидии у генотипических форм с разной цитоплазмой, при незначительном превосходстве линий с нормальной фертильной цитоплазмой. Однако достоверных различий между этими формами не установлено (рисунок 3). Таким образом, можно констатировать, что проявление гаплоидии и полиэмбрионии среди исследованных линий и их аналогов в большей степени зависит от сезона, чем от факторов стерильности цитоплазм.

Выводы:

1. У всех исследуемых линий обнаружены зародышевые мешки как нормального строения, так и аномальные: с дополнительными яйцеклетками (с двумя и тремя) и мегагаметофиты с партеногенетическим проэмбрио.
2. В формировании зародышевых мешков с дополнительными яйцеклетками и партеногенетическими проэмбрио у всех исследуемых генотипических форм выявлены сезонные различия. При этом у линий отсутствовала идентичная тенденция к увеличению или снижению частоты партеногенеза в одноименные годы.
3. При сравнении частот проявления партеногенеза у апробированных линий достоверных различий между ними не выявлено.
4. Вероятность развития полиэмбрионных семян зависит от условий года. Для всех генотипических форм более «урожайным» на полиэмбрионию оказался сезон №3 (максимальная частота её проявления – 0,5-0,6 %, и менее благоприятным – сезон №1 (частота от 0 до 0,3%,).
5. При существовании визуальных различий по частоте появления гаплоидии у генотипических форм с разной цитоплазмой, при незначительном превосходстве линий с нормальной фертильной цитоплазмой, достоверных различий между этими формами не установлено.
6. Проявление гаплоидии и полиэмбрионии у исследованных линий и их аналогов в большей степени зависит от условий сезона и в меньшей степени – от качества цитоплазмы.

