

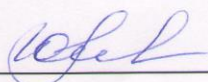
МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

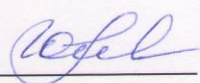
**ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ГАПЛОИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ ЗМС-П**

АВТОРЕФЕРАТ
МАГИСТЕРСКАЯ РАБОТА
Студента 2курса 241 группы
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Чиркова Никиты Владимировича

Научный руководитель
зав. кафедрой генетики,
д.б.н., доцент

4.06.19  О.И. Юдакова

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

4.06.19  О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Главным практическим значением гаплоидии является возможность быстрого создания гомозиготных линий путем диплоидизации гаплоидов. Для массового получения гаплоидов эффективно используются линии с гаплоиндуцирующей способностью. Использование таких линий в качестве опылителей позволяет получать гаплоиды с частотами, достаточными для решения различных фундаментальных и прикладных задач. Процесс создания новых гаплоиндукторов очень трудоемок, поскольку индивидуальный отбор проводят на основе результатов тестирования растений на способность к гаплоиндукции. Для этого пылью тестируемых растений опыляют различные материнские формы, после чего определяют частоту развития матроклиных гаплоидов в полученном потомстве. Снизить трудоемкость селекционных работ по выведению новых гаплоиндуцирующих линий можно было бы, упростив процедуру тестирования растений на способность к гаплоиндукции. Например, при условии, что пыльца растений-гаплоиндукторов способна стимулировать партеногенетическое развитие зародышей у самого себя, оценку частоты гаплоидии можно было бы проводить среди потомства, полученного при самоопылении. Это позволило бы избежать трудозатратного опыления других материнских форм.

Целями проведенного исследования было изучение цитозмбриологических особенностей гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П.

Для реализации данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) изучение структуры зрелых зародышевых мешков из неопыленных завязей растений линий кукурузы ЗМgl и ЗМС-П;
- 2) изучение структуры зрелых женских зародышевых мешков из опыленных завязей растений линий кукурузы ЗМС-П;
- 3) анализ частоты образования гаплоидных зародышей в потомстве, полученном при самоопылении.

Основное содержание работы. В данном разделе магистерской работы приводится анализ литературы по вопросам гаплоидии и ее использование в селекции и для решения теоретических задач, методов получения гаплоидов и способов получения гаплоидов, получение гаплоидов у кукурузы методом гаплоиндукции (*in vivo*).

Материалом исследования послужила линия ЗМС-П (Зародышевый маркер Саратовский-Пурпурный), полученная от линии ЗМС-8 с сильной гаплоиндуцирующей способностью.

Для изучения структуры зародышевых мешков из неопыленных и опыленных завязей материал фиксировали на третьи сутки после появления первых пестичных нитей и на пятые сутки после самоопыления растений. Завязи для анализа брали со средней и нижней части початка. Изучаемый материал был зафиксирован в фиксаторе Кларка в период массового цветения кукурузы.

Для оценки гаплоиндуцирующей способности в полевых условиях (в период с середины июля до первых чисел августа) было проведено самоопыление растений.

Женские соцветия материнских растений заранее изолировались пергаментными пакетами до появления первых рылец во избежание ненужного опыления. Затем на появившиеся рыльца наносилась предварительно собранная свежая пыльца линии-гаплоиндуктора ЗМС-П.

В результате скрещиваний было получено потомство F_1 , которое анализировали на частоту гаплоидии на стадии сухих зерновок и проростков. Частоту гаплоидии определяли как отношение количества гаплоидных проростков к общему количеству проанализированных, выраженное в процентах.

Всего было проанализировано 242 зародышевых мешка из неопыленных завязей гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-П и 233

зародышевых мешка контрольной линии 3Mgl. Зародышевые мешки для анализа брали со всего початка: с нижней, верхней и средней части.

У линии 3Mgl, которую использовали в качестве контроля, все зародышевые мешки имели типичное строение, соответствующее Polygonum-типу. Они являются восьмиядерными и семиклеточными, количество антипод до 15-20 клеток и более. Яйцевой аппарат трехклеточный. Яйцеклетка крупная, одноядрышковая, в синергидах хорошо виден нитчатый аппарат (рис.3). Зародышевые мешки линии ЗМС-П, в целом, имели такое же строение, за исключением одного зародышевого мешка, который оказался не сформированным.

В неопыленных завязях линии ЗМС-П присутствовали ЗМ как с двумя полярными ядрами (91,3%), так и с одним центральным ядром (8,3%) (табл. 1). У контрольной линии 3Mgl количество ЗМ с двумя полярными ядрами составило 93,6%, с одним центральным ядром – 6,4%.

Таким образом, в целом, зародышевые мешки линии ЗМС-П развиваются без отклонений от нормы, процент аномалий низкий и составил 0,4%, что находится в пределах нормы для кукурузы. Партеногенетического развития зародышей в неопыленных завязях растений линии ЗМС-П не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии склонности линии к наследуемому партеногенезу.

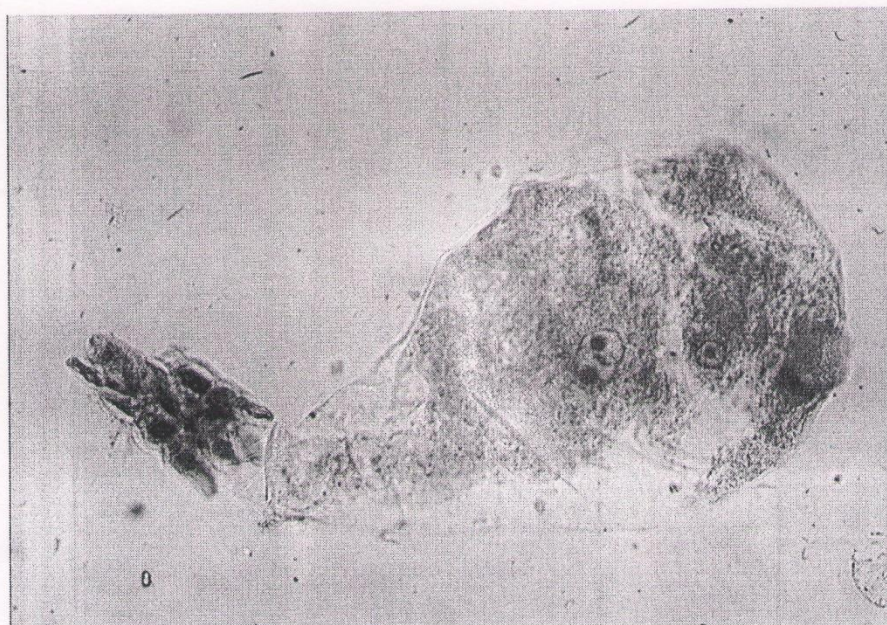


Рисунок 3 – Зародышевой мешок линии ЗМС-П (яц – яйцеклетка, пя – полярные ядра, ант – антиподы)

Таблица 1 – Результаты анализа зародышевых мешков из неопыленных завязей линии ЗМС-П

Линии	Часть початка	Количество ЗМ с:						Всего, шт
		двумя ПЯ		одним ЦЯ		отклонениями		
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	
ЗМС-П	нижняя	63	90,0	7	10,0	0	0,0	70
	средняя	85	89,5	10	10,5	0	0,0	95
	верхняя	73	94,8	3	3,9	1	1,3	77
всего		221	91,3	20	8,3	1	0,4	242
ЗМgl (контроль)	нижняя	54	93,1	4	6,9	0	0,0	58
	средняя	78	91,7	7	8,3	0	0,0	85
	верхняя	86	95,6	4	3,6	0	0,0	90
всего		218	93,6	15	6,4	0	0,0	233

Примечание: ПЯ – полярное ядро, ЦЯ – центральное ядро

Был проведен анализ 183 зародышевых мешков из завязей самоопыленных растений гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-П (табл. 2). Среди проанализированных ЗМ, в которых, скорее всего, не произошло оплодотворение (17,9%), присутствовали ЗМ как с двумя полярными ядрами (13,0%), так и с одним центральным ядром (4,9%) и интактная яйцеклетка. В 145 из 183 ЗМ опыленных завязей присутствовали проэмбрио и эндосперм. За редким исключением эндосперм находился на клеточной стадии. Наблюдались следующие отклонения от нормы:

а) в одном зародышевом мешке присутствовал проэмбрио и 4 полярных ядра;

б) в трех зародышевых мешках присутствовал проэмбрио и по 2 полярных ядра;

в) в одном зародышевом мешке присутствовал проэмбрио и эндосперм на ядерной стадии.

Таблица 2— Результаты анализа зародышевых мешков линии ЗМС-П после самоопыления

Часть початка	Количество ЗМ с 2 ПЯ			Количество ЗМ с 1 ЦЯ			Количество ЗМ с эндоспермом и проэмбрио			Количество аномальных ЗМ			Всего, шт.
	шт.	всего	%	шт.	всего	%	шт.	всего	%	шт.	всего	%	
верхняя	10	24	13	6	9	4,9	51	14	79	1	5	2,7	183
средняя	8			2			46			3			
нижняя	6			1			48			1			

Примечание: ПЯ – полярное ядро, ЦЯ – центральное ядро

Таким образом, в самоопыленных завязях линии ЗМС-П присутствовали зародышевые мешки с отклонениями в развитии (2,7% от общего количества проанализированных зародышевых мешков). Среди оплодотворенных мешков их количество составило 3,3%. В связи с тем, что линии ЗМС-П не свойственен наследуемый партеногенез и уровень аномалий среди ЗМ из неопыленных завязей низкий, отклонения от нормы, вероятнее всего, связаны с нарушением процесса оплодотворения, вызванными какими-то аномалиями мужского гаметофита.

Для изучения возможности индуцировать развития матроклиных гаплоидов при самоопылении перед появлением пестичных нитей початки изолировали пергаментными изоляторами и через 3-5 дней опыляли пыльцой, собранной с тех же растений. Завязавшемся зерновки проращивали в медицинских кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Всего было проанализировано около 4000 зерновок 29 початков. Гаплоиды на стадии проростков выявляли с помощью морфометрического метода. Для подтверждения пloidности использовали цитологический метод давленных препаратов корешков (рис.4).

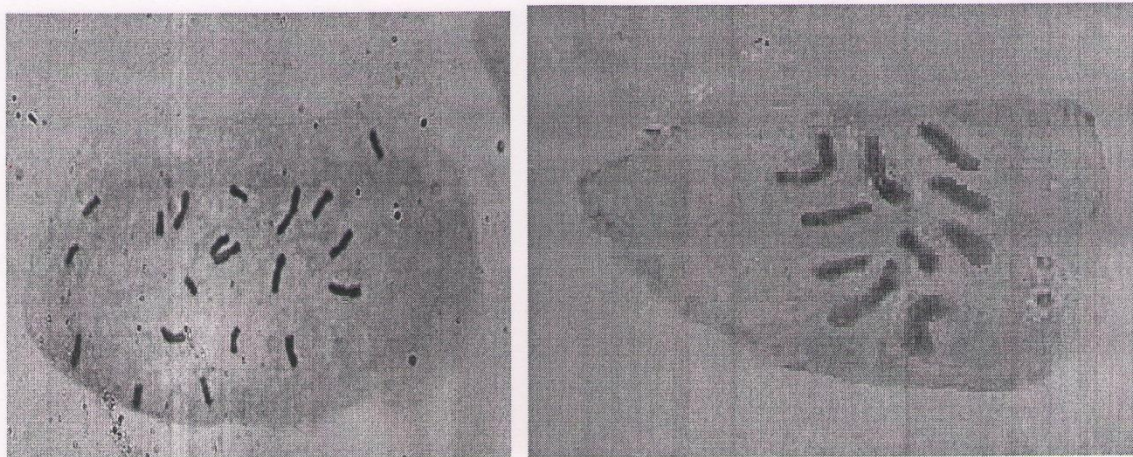


Рисунок 4 – Препараты давленных корешков проростков кукурузы: слева- диплоид $2n=20$; справа- гаплоид $1n=10$.

Проведенный анализ показал, что при самоопылении, гаплоиды развиваются с частотой от 1 до 5 на початок. Частота зерновок с гаплоидным

зародышем от количества проросших зерновок на одном початке варьировала от 0,5 до 36,3% (табл. 3). Гаплоиды отличались от диплоидов меньшими размерами, формой первого листа и ускоренными темпами развития.

Все без исключения проанализированные початки характеризовались неполной озерненностью и наличием значительного количества дефектных зерновок. Эти признаки можно использовать как диагностические при отборе линий на способность к гаплоиндукции. Среди дефектных зерновок выделяли: беззародышевые зерновки с хорошо развитым эндоспермом, щуплые зерновки с зародышем, щуплые зерновки без зародыша, плёчатые зерновки (полное отсутствие эндосперма у зерновки). При проращивании дефектных зерновок наблюдалось прорастание зерновок, имеющих зародыш.

Таблица 3 – Распределение гаплоидов по початкам у линии ЗМС-П при самоопылении

№ початка	Озерненность (в долях на початок)	Общее количество зерновок, шт.	Количество проросших зерновок		
			всего, шт.	с гаплоидным зародышем	
				шт.	%
1	2/3	125	110	1	0,91
2	2/3	121	108	1	0,92
3	2/3	95	83	1	1,20
4	2/3	117	107	1	0,93
5	1/3	39	21	1	4,76
6	3/4	131	127	2	1,57
7	2/3	143	127	1	0,79

8	1/2	109	95	2	2,10
9	3/4	159	141	1	0,71
10	2/3	133	130	1	0,77
11	5/6	163	162	1	1,23
12	2/3	115	75	3	4,00
13	5/6	150	112	2	1,78
14	2/3	96	56	4	7,14
15	2/3	130	166	3	1,80
16	2/3	140	125	2	1,60
17	1	128	199	1	0,50
18	2/3	157	148	1	0,67
19	1/3	104	69	3	4,35
20	2/3	123	126	5	3,97
21	1/2	49	29	4	13,79

Таким образом, гаплоиды среди потомства линии ЗМС-П достаточно легко выявляются морфометрическим методом. Средняя частота гаплоидии для самоопылённого варианта составила 3,7%, что несколько ниже частоты гаплоиндукции линии ЗМС-П при перекрёстном опылении (10%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитоэмбриологический анализ показал, что структура зародышевых мешков гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П не отличается от структуры мегагаметофитов линий, не способных к гаплоиндукции. Также, не зарегистрировано ни одного случая образования партеногенетического зародыша в неопыленных зародышевых мешках линии ЗМС-П. Результаты анализа ЗМС-П свидетельствуют о том, что у нее отсутствует склонность к наследственному партеногенезу, и она способна образовывать гаплоидные зародыши при опылении собственной пылью.

Анализ зародышевых мешков из завязей самоопыленных растений показал отклонения от нормы (3,3%), что вероятнее всего, связаны с нарушением процесса оплодотворения, вызванными аномалиями мужского гаметофита.

Средняя частота гаплоидии для самоопылённого варианта составила 3,7%, при перекрёстном опылении (10%).

Такие выявленные особенности линии ЗМС-П, как отсутствие у растений цитоэмбриологических признаков наследуемого партеногенеза, с одной стороны, и наличие гаплоидов в потомстве от самоопыления, с другой стороны, позволяют констатировать, что пыльца растений может индуцировать развитие гаплоидов у собственных растений. Это позволяет значительно упрощать процесс селекции новых гаплоиндуцирующих линий, исключая длительный и трудоемкий процесс тестирования на способность к гаплоиндукции на разных материнских формах, и используя более простой способ тестирования по количеству гаплоидов в самоопыленном потомстве.

ВЫВОДЫ

1. Линия ЗМС-П не имеет склонности к наследуемому партеногенезу. Об этом свидетельствует низкий уровень аномалий развития женских гаметофитов (0,4%) и отсутствие партеногенетического развития яйцеклеток в неоплодотворенных зародышевых мешках.

2. Развитие у растений линии ЗМС-П семян с гаплоидными зародышами при самоопылении с частотой 3,7%, свидетельствует о том, что партеногенетическое развитие яйцеклеток было индуцировано опылением растений собственной пылью. Эта особенность позволяет проводить отбор

на гаплоиндукцию в самоопыленном потомстве при селекции новых гаплоиндуцирующих линий.

