

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

Кафедра генетики

**ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* НА МИТОЗ В КОРНЕВОЙ
МЕРИСТЕМЕ ДИПЛОИДНОЙ И ТЕТРАПЛОИДНОЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Шульгиной Ангелины Евгеньевны

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук

Алаторцева Т.А. Алаторцева
подпись, дата

Научный консультант:
ст. науч. сотр. ФГБНУ
«ФАНЦ Юго-Востока»,
канд. биол. наук

Колесова А.Ю. Колесова
подпись, дата

Зав. кафедрой генетики:
профессор, д-р. биол. наук

Юдакова О.И. Юдакова
подпись, дата

Саратов 2021

Введение

Одной из важных задач, стоящих перед генетиками и селекционерами, является разработка способов сохранения и воспроизведения ценных генотипов. Для решения подобных задач перспективным является метод культуры *in vitro*. Метод является приоритетным в отношении отдалённых, гетерозисных гибридов и полиплоидных форм, которые относятся к разряду трудновоспроизводимых. Однако введение растений в культуру *in vitro* часто сопровождается сомаклональной изменчивостью, которая, с одной стороны значительно повышает генетическое разнообразие, позволяющее выделять клонны с улучшенными показателями, с другой стороны создаёт трудности в получении генетически однородного посадочного материала. Особое место среди вводимых в асептическую культуру растительных объектов занимают полиплоидные формы, которые при наличии в кариотипе дополнительных наборов хромосом, изначально представляют собой источник изменчивости. Изменение числа и формы хромосом ведёт к морфологическим и физиологическим изменениям в растительном организме. При воспроизведении полиплоидов *in vitro* естественная склонность к изменчивости может проявиться на фоне сомаклональной изменчивости, вызванной условиями культивирования. Для использования полиплоидов в селекции необходимо изучение механизмов их изменчивости, которая проявляется и на стадии клеточного деления. Более ценными полиплоидами являются сельскохозяйственные растения, используемые не только для производства зерна, но для получения биомассы. К их числу принадлежит и кукуруза, значимость которой как зерновой, пищевой и кормовой культуры общеизвестна.

В связи с этим работа, посвящённая сравнительному исследованию митоза у форм кукурузы разной плюидности в условиях *in vitro* и *in vivo*, является актуальной и практически значимой.

Новизна данного исследования заключается в уникальности изучаемых форм кукурузы и самом сравнительном анализе митотического деления у растений разной плюидности.

Цель настоящей работы:

Провести сравнительный анализ качественных и количественных характеристик митотического деления у диплоидной и тетраплоидной форм кукурузы в разных условиях проращивания зерновок.

В задачи эксперимента входило:

1. Исследовать стадии митоза в клетках апикальной меристемы корня кукурузы разной пloidности, выявить возможные аномалии процесса деления.
2. Сравнить митотическую активность и продолжительность стадий митоза в клетках разной пloidности.
3. Выявить факторы, способные влиять на митотическую активность клеток корневой меристемы проростков.
4. Дать сравнительную характеристику скорости роста корней у проростков разной пloidности.
5. Определить возможные причины гигантизма растений полиплоидной кукурузы.

Основное содержание работы

Предположительно переход растений кукурузы на более высокий уровень пloidности, приводящий к увеличению размеров самого растения и его органов (рисунок 1), должен обеспечиваться увеличением размеров клеток и сопровождаться изменениями на уровне митоза.



Рисунок 1 – Соотносительные размеры зерновок кукурузы разного уровня пloidности: 2 n (слева) и 4n

В связи с этим было проведено сравнительное изучение митотического деления у форм кукурузы с ди- и тетрапloidным наборами хромосом.

Качественная характеристика стадий митоза. Процесс митоза исследовали в клетках апикальной меристемы кончиков корней 2-3-суточных проростков. Было установлено, что процесс клеточного деления у диплоидной формы проходит в целом нормально (рисунок 2).

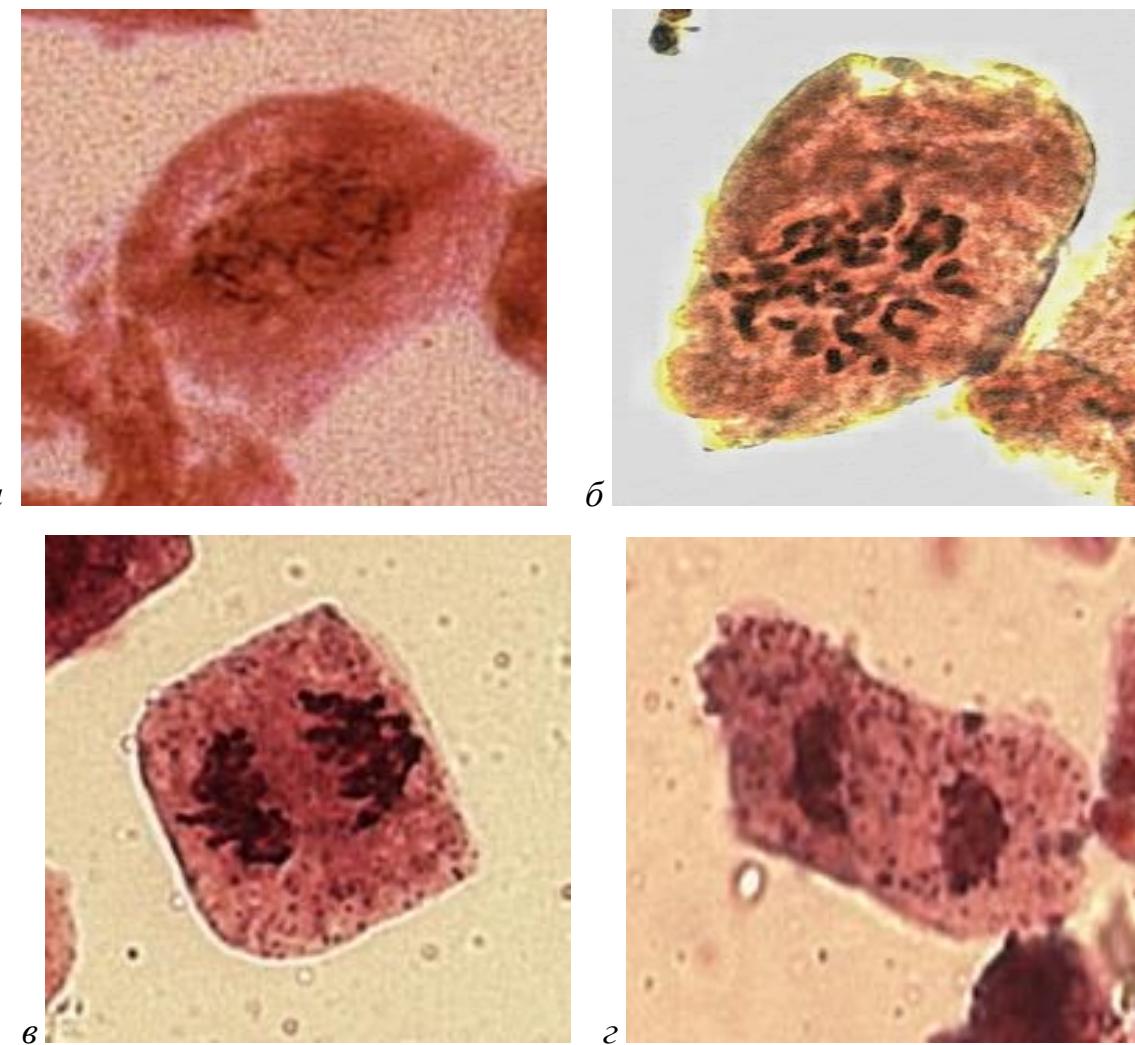


Рисунок 2 – Митоз в клетках диплоидной кукурузы линии ГПЛ-1:

а – профаза; *б* – метафаза; *в* – анафаза; *г* – телофаза

В некоторых клетках на стадии интерфазы было замечены ядра с дополнительными ядрышками, на стадии метафазы ахроматиновое веретено приняло необычное положение, что хорошо видно на рисунке 3.

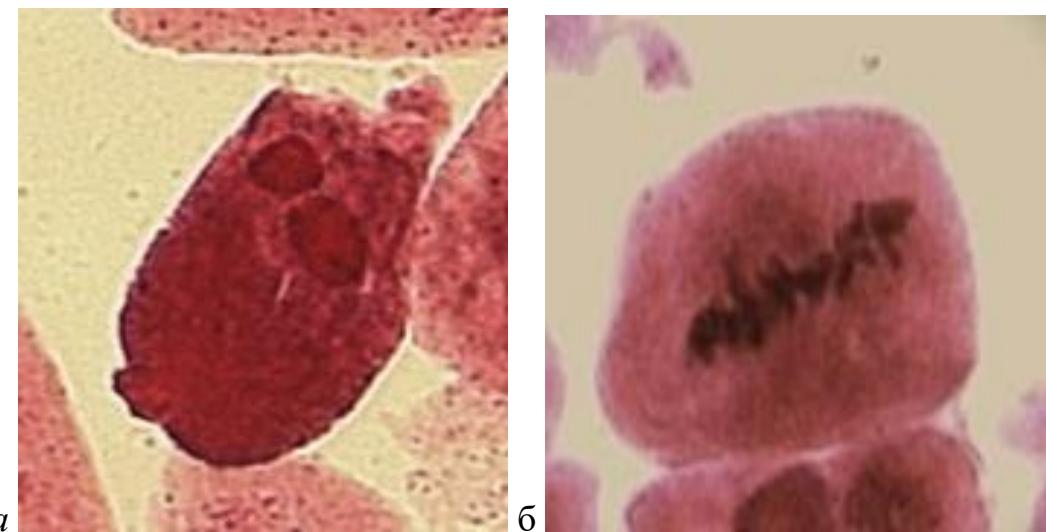


Рисунок 3 – Отклонения в митозе у диплоидных форм:

а - клетка диплоидной кукурузы линии ГПЛ –1 с двумя ядрышками; *б* - наклонное расположение веретена деления в диплоидных клетках кукурузы линии ГПЛ-1

У тетраплоидной формы кукурузы ЧТ чаще, чем у диплоидной линии при любых условиях проращивания семян встречались клетки с дополнительными ядрышками (рисунок 4).

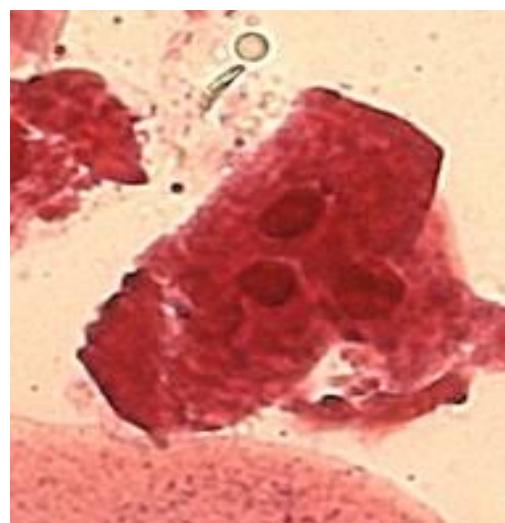


Рисунок 4 – Клетки тетраплоидной формы кукурузы ЧТ с разным количеством ядрышек

Наряду с нормой, которая представлена на рисунке 5, у этих растений

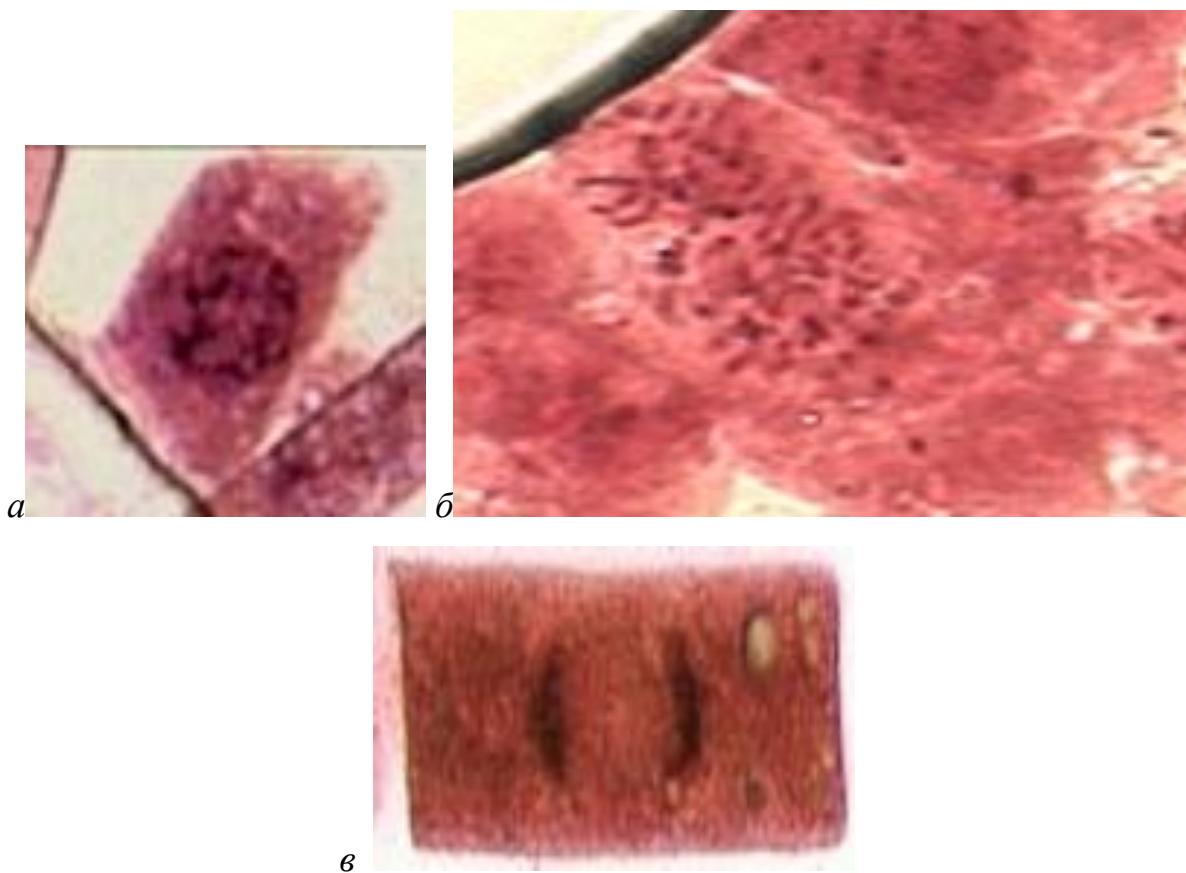


Рисунок 5 – Митоз в клетках тетрапloidной формы кукурузы КРП-1:
 а – профаза; б – метафаза; в – анафаза

чаще, чем у диплоидов, обнаруживались клетки с аномальным положением веретена деления. Ахроматиновое веретено и метафазная пластина во многих клетках были сдвинуты в одну сторону и/или располагались наклонно, что могло провоцировать нарушения при расхождении хроматид на стадии анафазы. И как следствие — образование одиночных мостов и выбросы хромосом за пределы веретена деления (рисунок 6).

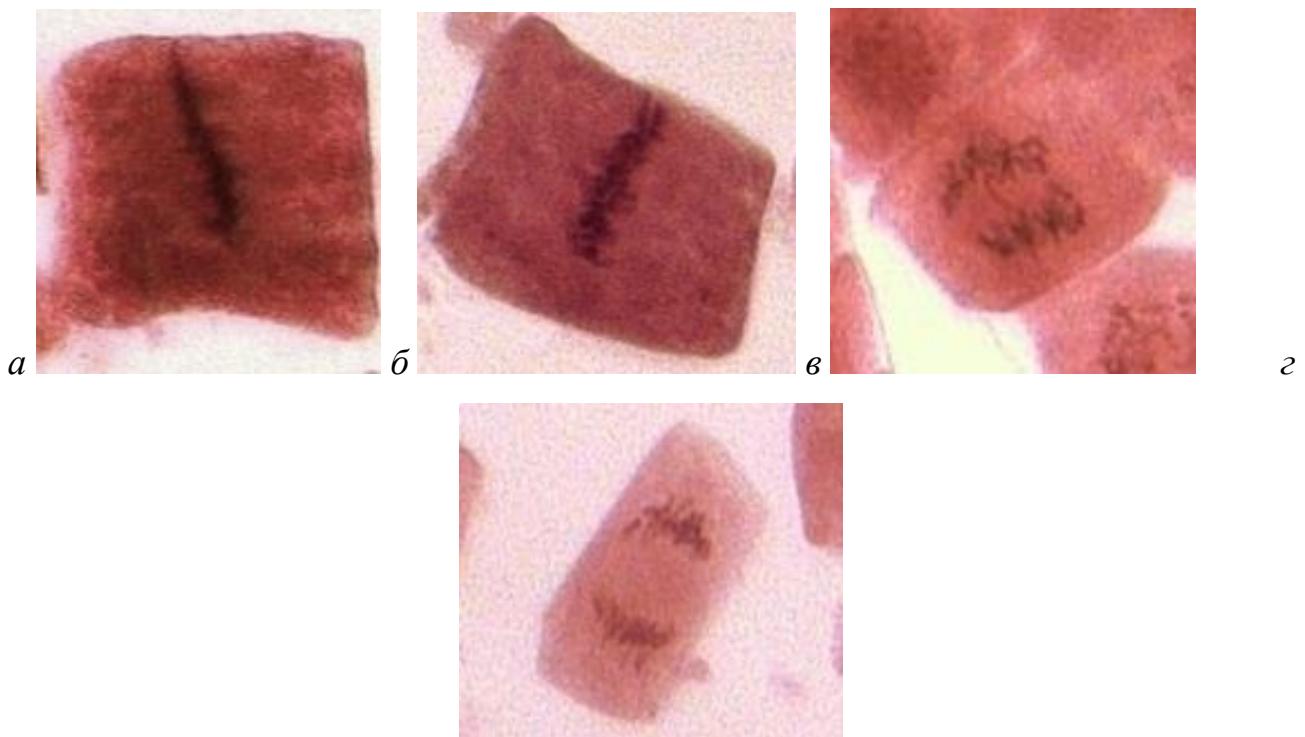


Рисунок 6 – Аномалии митоза у тетраплоидной кукурузы линии ЧТ:
 а, б — асимметричность в расположении веретена деления у тетраплоидной кукурузы линии ЧТ; в - одиночный мост; г – выброс фрагментов хромосом

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что увеличение хромосомных наборов в кариотипе тетраплоидной кукурузы, сопровождающееся нарушениями процесса митотического деления, приводит к мозаичности клеток в отношении числа хромосом и далее служит причиной изменчивости полиплоидных форм.

Количественная характеристика митоза. Для оценки способности клеток к делению использовались морфометрические методы.

Митотический индекс. Принимая во внимание точку зрения С.Г. Навашина, что митотическая активность клеток обратно пропорциональна их размерам, были проведены подсчеты митотического индекса (МИ) клеток корневой меристемы проростков кукурузы, полученных в разных условиях проращивания зерновок: на смоченной водой фильтровальной бумаге (контроль), в пробирках с питательной средой MS без гормонов и в пробирках с

той же питательной средой MS без гормонов с последующим выдерживанием проростков в пробирках с водой. Митотический индекс подсчитывали по частоте встречаемости митозов на 1000 клеток. Расчет по формуле:

$$MI = (P+M+A+T)/(I+P+M+A+T) \times 100\%,$$

где P – число клеток в профазе, M – метафазе, A – анафазе, T – телофазе, I – интерфазе.

Результаты статистической обработки представлены на рисунке 7.

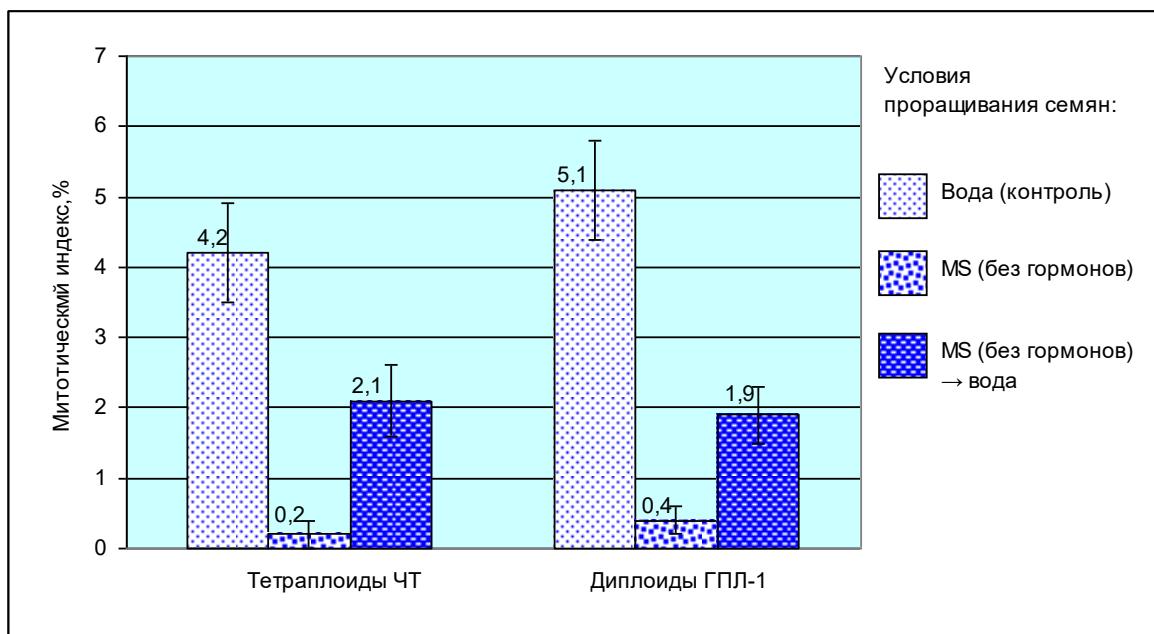


Рисунок 7 – Митотический индекс клеток проростков кукурузы
разного уровня пloidности

Было установлено, что большей митотической активностью обладают клетки корней проростков, выросших на чашках Петри в чистой водной среде без добавления агар-агара, минеральных солей и витаминов. В этих условиях в клетках диплоидной кукурузы был зафиксирован достоверно самый высокий (5,1%) митотический индекс. В то время как в тех же условиях у тетраплоидов он составил 4,2%. Меньшей активностью обладали клетки корней проростков, которые были выращены на искусственной питательной среде и в последующем были перенесены в воду. Самой низкой митотической активностью обладали клетки диплоидных и тетраплоидных проростков, появившиеся из зерновок на безгормональной питательной среде MS без перенесения в воду.

Продолжительность стадий митоза. Для более точной характеристики митотического деления клеток кукурузы разной пloidности в разных условиях развития растений было проведено сравнение длительности стадий митоза, которая вычислялась исходя из частоты встречаемости профаз, метафаз, анафаз и телофаз в проанализированных клетках. Результаты статистической обработки результатов представлены на рисунках 8 и 9. Замечено, что частота встречаемости клеток любого типа пloidности на стадии профазы выше частоты встречаемости клеток, находящихся на других стадиях деления.

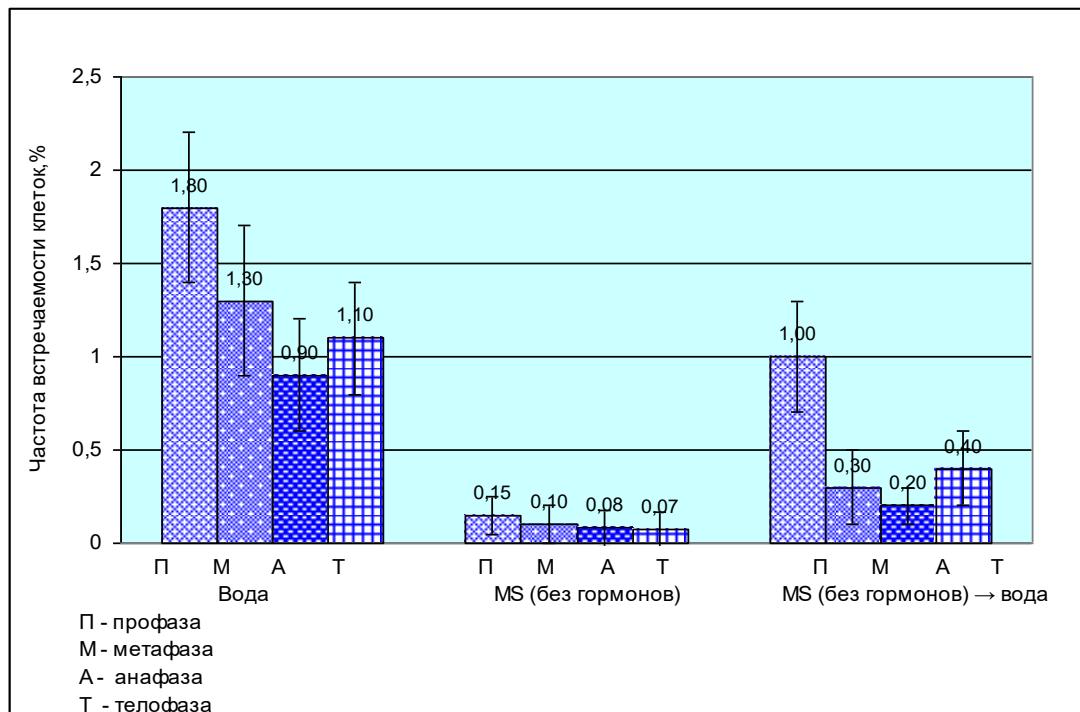


Рисунок 8 – Частота встречаемости клеток на разных стадиях митоза у диплоидной кукурузы в разных условиях проращивания зерновок

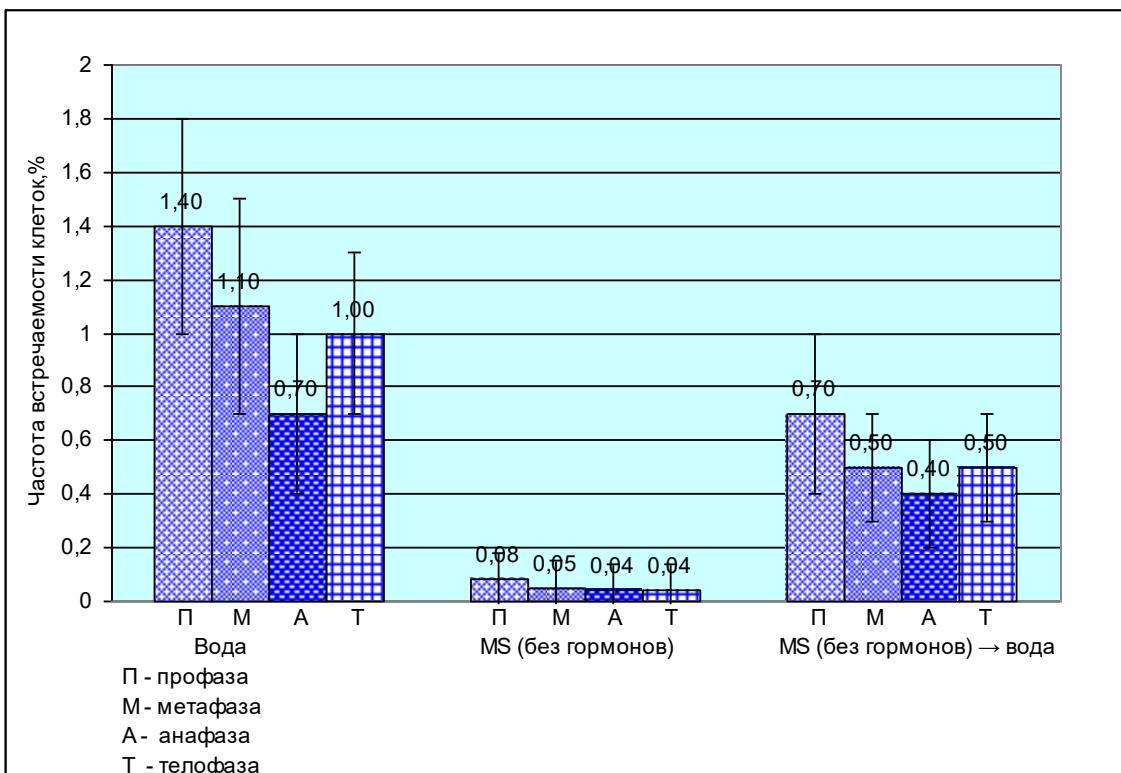


Рисунок 9 – Частота встречаемости клеток на разных стадиях митоза у тетраплоидной кукурузы в разных условиях проращивания зерновок

Это позволило нам заключить, что у форм кукурузы разной пloidности профаза является более продолжительной по времени стадией по сравнению с метафазой, анафазой и телофазой.

Скорость роста корней проростков. Анализ клеток на стадии митотического деления был дополнен изучением роста корней, определением его скорости. Результаты этих измерений представлены на рисунке 10.

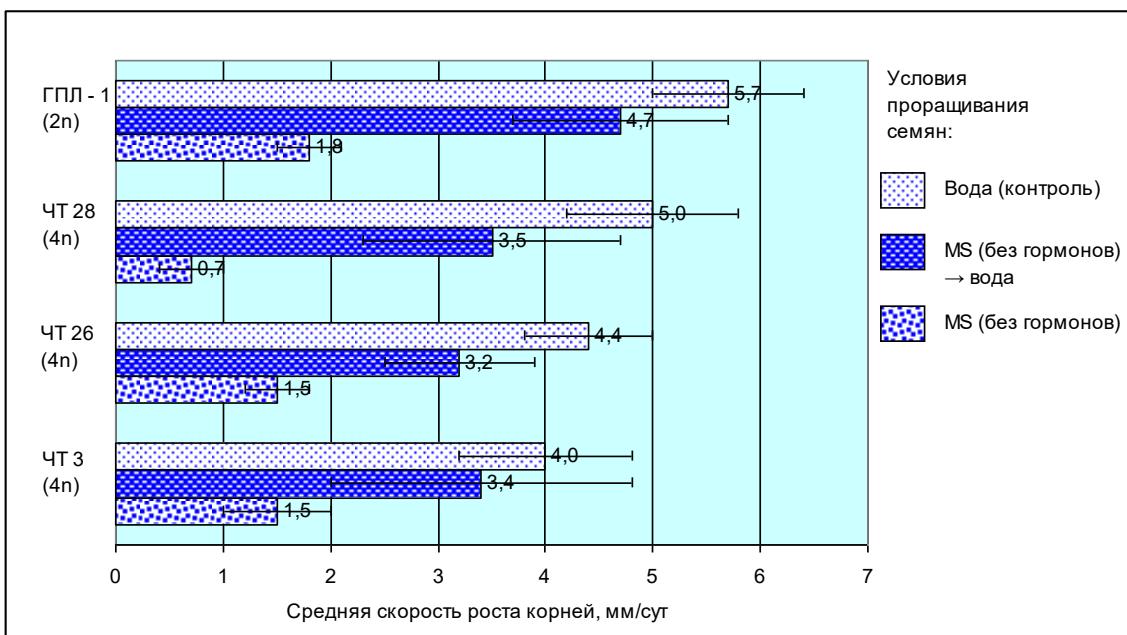


Рисунок 10 – Скорость роста корней проростков диплоидной (ГПЛ-1) и тетрапloidной (ЧТ) кукурузы

На гистограммах этого рисунка видно, что наибольшей скоростью роста обладают корни проростков диплоидной кукурузы и меньшей – тетрапloidной, что согласуется с соответствующими уровнями митотического индекса для этих растений.

Кроме того, учитывая большой рост тетрапloidных растений и более низкий митотический индекс клеток корней, можно предположить, что увеличение высоты растений тетрапloidной кукурузы при не очень широком стебле-соломине происходит не только за счет митоза, но и за счёт растяжения клеток.

Заключение

Подводя итог проведенному исследованию, следует сделать заключение, что полиплоидные формы кукурузы обладают широким спектром изменчивости, которая проявляется на уровне митотического деления. У них по сравнению с исходными диплоидами, заметно изменяются размеры самого растения, его органов, величина, форма и количество семян. Увеличение пloidности может сопровождаться сдвигом сроков созревания семян. В некоторых случаях повышается устойчивость к инфекциям.

Являясь источником изменчивости, полиплоидные формы представляют собой перспективный исходный материал для селекционной работы, на основе которого могут быть созданы новые высокопродуктивные сорта сельскохозяйственных и эффектных декоративных растений.

По результатам работы сделаны следующие выводы:

1. Во всех вариантах прорацивания зерновок диплоидной кукурузы процесс деления клеток корневой меристемы проходит в целом без нарушений, за исключением редких случаев наклонного расположения метафазной пластинки в то время как, наклонное расположение веретена деления, сдвиг ахроматинового веретена к одной стороне клетки, появление мостов и фрагментов хромосом являются характерными особенностями митоза клеток тетраплоидов.

2. Наибольшей митотической активностью (митотический индекс 5,1%) обладают клетки корневой меристемы диплоидных проростков, выросших на чашках Петри в чистой водной среде, по сравнению с тетраплоидами, у которых в тех же условиях митотический индекс составил 4,2%.

3. Самой длительной по времени стадией митоза всех клеток является профаза, при этом она более продолжительная у диплоидов, по сравнению с тетраплоидами.

4. Низкий митотический индекс клеток диплоидных и тетраплоидных проростков, появившихся на безгормональной среде MS без перенесения в

воду, вероятно, обусловлен негативным влиянием минеральных компонентов питательной среды на процесс клеточного деления.

5. Наибольшей скоростью роста обладают корни проростков диплоидной кукурузы и меньшей – тетраплоидной, что согласуется с соответствующими уровнями митотического индекса для этих растений.

6. Учитывая большой рост полипloidных растений и в некоторых случаях низкий митотический индекс, можно предположить, что удлинение стебля у тетраплоидной кукурузы происходит не только за счёт митотической активности, но и за счет увеличения размеров клеток.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "А. В. Григорьев".