

УДК 581.331

## ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

**А. Ю. Колесова, Л. П. Лобанова**

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского  
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83  
E-mail: kolesovaau@yandex.ru*

Исследованы особенности строения зародышевых мешков и пыльцы у триплоидных гибридных растений кукурузы. Показано, что аномальное развитие гаметофитов обусловлено прежде всего триплоидным уровнем растений. Предполагается, что некоторые специфические изменения могут быть вызваны присутствием у изученных растений генома партеногенетической линии АТ-1, которая использовалась в качестве опылителя при получении триплоидных растений.

**Ключевые слова:** кукуруза, триплоиды, зародышевые мешки, пыльца.

## CYTOEMBRYOLOGICAL STUDYING OF TRIPLOID PLANTS OF MAIZE

**A. U. Kolesova, L. P. Lobanova**

Structure peculiarity of embryo sacs and pollen of hybrid triploid plants in maize was investigated. It is shown first of all that triploid level of the studied plants is the bottom of abnormal gametophytes development. It is supposed that some specific changes can be caused by present of the parthenogenetic line AT-1 genome. this line was used as a pollinator by triploid plants creating.

**Key words:** maize, triploid, embryo sac, pollen.

Актуальность изучения фертильности и особенностей строения женского и мужского гаметофитов триплоидных растений кукурузы обусловлена рядом причин. Во-первых, триплоидный уровень генома способствует повышению изменчивости генетического материала и может использоваться для получения разных типов анеуплоидов, которые активно изучаются, в том числе и молекулярно-генетическими методами (Cooper, Birchler, 2001; Lee, Coe, Darragh, 1996). Во-вторых, триплоидные растения являются распространенной примесью при создании тетраплоидной кукурузы, что предполагает оценку степени опасности засорения

ими тетраплоидных популяций. В наших исследованиях необходимо было также определить возможность переноса триплоидным гибридным растениям генетически обусловленной склонности к апомиксису от диплоидной линии.

Целью настоящей работы был анализ ряда репродуктивных характеристик, таких как качество пыльцы и особенности строения зародышевых мешков (ЗМ).

### **Материал и методы**

Объектами исследования послужили триплоидные растения, полученные при опылении тетраплоидной формы кукурузы КрП-1 пыльцой диплоидной партеногенетической линии АТ-1. В качестве контроля использовались диплоидные растения АТ-1. Для линии КрП-1 характерно полное отсутствие признаков апомиксиса, а линия АТ-1, напротив, характеризуется достаточно высокой частотой партеногенеза, автономного развития эндосперма и образования нередуцированной пыльцы (Тырнов, Еналеева, 1983; Еналеева, Тырнов, 1994; Enaleeva, Tyrnov, 1997). Последнее делает возможным проведение работ по гибридизации в связи с созданием полиплоидной апомиктической кукурузы.

Для фиксации пыльников и неопыленных изолированных початков использовали ацетоалкоголь (3 : 1). Початки фиксировались через 4 суток после появления рылец. Приготовление препаратов ЗМ проводили с помощью метода ферментативной мацерации с последующей диссекцией семязачек (Еналеева и др., 1972) и их окраской в ацетокармине. Анализ строения пыльцевых зерен (ПЗ) проводили на временных препаратах, приготовленных по специальной методике (Юдакова и др., 2012), которая включала обработку железоммонийными квасцами, окраску ацетокармином и просветление в смеси хлоралгидрата с глицерином или в 45% уксусной кислоте.

Анализ препаратов ЗМ и пыльцы проводился на микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×40 или 10×63.

### **Результаты и их обсуждение**

При анализе 500 ЗМ у линии АТ-1 были выделены три основных группы ЗМ: с типичным строением, с измененной структурой яйцевого аппарата и с автономным эмбриогенезом. ЗМ нормального строения имели одну яйцеклетку (ЯК), две синергиды, два полярных ядра (ПЯ) или

одно центральное ядро (ЦЯ) и комплекс антипод из 8–20 клеток. Морфология таких ЗМ соответствовала описаниям, сделанным для других форм кукурузы. Однако следует отметить одну особенность: полярные ядра у линии АТ-1 очень редко сливаются перед оплодотворением (табл. 1), что может коррелировать с возможностью развития у этой линии автономного эндосперма.

Таблица 1

**Состояние зародышевых мешков линии АТ-1 из неопыленных завязей через 8 суток после появления рылец**

№ растения	Всего ЗМ	ЗМ (%) с:						Число антипод, шт.
		двумя ПЯ	одним ЦЯ	одной ЯК	тремя ПЯ	двумя и более ЯК	с развитием зародыша	
1	100	98	2	87	0	0	17	8–16
2	100	99	0	97	1	1	2	8–20
3	100	96	4	97	0	2	1	8–20
4	100	99	1	100	0	0	0	8–20
5	100	91	9	90	0	3	7	10–20
среднее		96.6	3.2	94.2	0.2	1.2	5.4	8–20

Примечание. В одном ЗМ возможно нарушение нескольких признаков.

Изменения типичной структуры обнаружены в 7 ЗМ. Только один из них содержал три полярных ядра, остальные содержали по одной или две дополнительных яйцеклетки (см. табл. 1), которые у линии АТ-1 возникают в результате деления первичной яйцеклетки и заложения продольной перегородки в первом делении митоза (Еналеева, Тырнов, 1994). Частота ЗМ с яйцеклеткоподобной синергидой была незначительна и составила 0,2%.

В 27 ЗМ (5,4%) наблюдались зародыши, число клеток в которых варьировало от 8 до 24 (см. табл. 1). Некоторые ЗМ содержали развивающийся зародыш и одну или две яйцеклетки, или два одновременно развивающихся зародыша. Изоляция початков и отсутствие следов пыльцевой трубки указывают на автономное развитие таких зародышей.

Результаты анализа 376 ЗМ от 4 триплоидных растений представлены в табл. 2. Выявлено, что у триплоидов повышено число ЗМ с тремя и четырьмя полярными ядрами и с яйцеклеткоподобными синергидами. В

ЗМ нормального строения триплоидных растений наблюдается тенденция к возрастанию вариабельности числа антиподальных клеток и формированию крупных 1–2-ядерных дополнительных клеток, расположенных обычно в районе антипод. Зародышевые мешки с дополнительными яйцеклетками или развивающимися зародышами не обнаружены, но в одном ЗМ зарегистрирована яйцеклетка на стадии метафазы, а в другом синхронное деление двух полярных ядер.

Таблица 2

**Состояние неопыленных зародышевых мешков у триплоидных растений кукурузы через четверо суток после появления рылец**

№ растения	Всего ЗМ	ЗМ (%) с:					Число антипод, шт.
		двумя ПЯ	одним ЦЯ	тремя и более ПЯ	яйцеклеткоподобной синергидой	дополнительной клеткой	
502.1	80	87,5	7,5	5,0	0,0	2,5	3–22
502.2	166	77,1	14,5	8,4	1,2	3,6	6–40
502.6	70	71,4	20,0	8,6	2,8	0,0	8–30
502.7	60	90,0	6,7	3,3	0,0	0,0	8–30
среднее		80,3	12,8	7,0	1,1	2,1	8–26

Примечание. В одном ЗМ возможно нарушение нескольких признаков

Таким образом, несмотря на то что у триплоидов не обнаружены партеногенетические зародыши, зарегистрированная тенденция к дополнительным делениям в центральной клетке, антиподах и даже в яйцеклетке может указывать на влияние генома партеногенетической линии АТ-1 на развитие ЗМ у триплоидных гибридов. Возможно, что признак «развитие партеногенетического зародыша» проявился бы на триплоидном уровне несколько позже при более поздних сроках фиксации завязей.

Качество пыльцы считается одним из критериев оценки популяций на склонность к апомиксису и тесно связано с плодовитостью растений. В соответствии с методикой, предложенной П. Г. Куприяновым, к дефектной пыльце были отнесены мелкие и крупные пыльцевые зерна (ПЗ) и с разной степенью плазмоллиза, вплоть до полной дегенерации цитоплазмы и ядер (Куприянов, 1989).

Степень дефектности пыльцы (СДП) у исследованных триплоидных растений оказалась выше, чем у диплоидных (табл. 3). Эти различия до-

стоверны и обнаружены при фиксации пыльников в разные годы, что указывает на патологию развития пыльцевых зерен, обусловленную прежде всего несбалансированностью триплоидного генома. Однако пыльца разных лет фиксации различалась по годам соотношением классов дефектных ПЗ. Основная доля дефектной пыльцы у триплоидов в 2008 г. представлена пыльцой среднего размера с разной степенью плазмолиза или полностью дегенерировавшей. Важным отличием триплоидов 2010 г. явилось заметное увеличение доли крупных ПЗ. Увеличение числа крупных пыльцевых зерен у триплоидов может косвенно указывать на возможность передачи гибридным триплоидным растениям склонности к нередукции пыльцы, встречаемой у линии АТ-1, усиленной несбалансированностью генома, а в 2010 г. еще и условиями жаркого засушливого лета.

Таблица 3

Степень дефектности пыльцы у диплоидных и триплоидных растений кукурузы

Вариант, плоидность, год	№ растений	СДП, %	Мелкие ПЗ, %			Средние ПЗ, %			Крупные ПЗ, %		
			пустые	выполненные	плазмолизированные	пустые	выполненные	плазмолизированные	пустые	выполненные	плазмолизированные
АТ-1 (2n) 2008 г.	1–5	398	0,00	0,00	0,24	0,59	96,02	1,80	0,00	1,11	0,24
АТ-1 (2n) 2010 г.	1–3	9,98	0,00	0,00	1,48	2,50	90,02	2,80	0,00	2,14	1,06
КрП-1 × АТ-1 (3n) 2008 г.	1–2	16,66*	0,00	4,20	0,34	5,76*	83,34*	5,59	0,12	2,80	0,70
КрП-1 × АТ-1 (3n) 2010 г.	1–4	22,21*	1,64	1,69	1,46	1,87	77,79*	4,33	2,92	3,75	4,55

Примечание. \* различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,05.

Выполненные пыльцевые зерна во всех вариантах чаще всего имеют нормальное трехклеточное строение и содержат одно вегетативное ядро (ВЯ) и два спермия (СП). Однако структурные изменения в пыльце триплоидных растений встречаются в 3–5,5 раз чаще, чем у диплоидных (табл. 4).

Они представлены двумя основными типами: остановкой развития на ранних стадиях и увеличением числа ядер и клеток в зрелой пыльце. Пыльцевые зерна с незавершенным развитием (одно- и двухъядерные)

Таблица 4

**Результаты анализа выполненной пыльцы у диплоидных и триплоидных растений кукурузы урожая 2008 и 2010 гг.**

Год	Вариант, плоидность	Число проанализированных растений	ПЗ нормального строения, %	ПЗ с измененным числом ядер и клеток, %				
				всего	1-ядерные	с 2 ВЯ	с 3–4 ВЯ	с 2 ВЯ и 2 СП
2008	АТ-1 (2n)	5	91,09	4,91	1,00	3,91	0,00	0,00
	КрП-1×АТ-1 (3n)	2	85,48	14,53*	3,55	9,08	1,24	0,65
2010	КрП-1×АТ-1 (3n)	4	71,79	28,21*	6,54	18,0	1,67	2,00

Примечание: \* различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,05.

были обнаружены и у диплоидных и у триплоидных растений, а с дополнительными клеточными элементами – только у триплоидных.

Таким образом, полученные при анализе пыльцы данные свидетельствуют о достоверных различиях по уровню СДП между диплоидными и триплоидными растениями. Различия между триплоидами в разные годы фиксации пыльцы выражены слабее. Вероятно, триплоидный уровень растений, приводящий к несбалансированности генома, является основной причиной нарушения развития пыльцы.

Достаточно высокий процент образования у триплоидных растений кукурузы зародышевых мешков и пыльцевых зерен нормального строения указывает на их относительно высокую плодovitость. Однако ожидаемый при этом разнохромосомный состав их потомства делает нежелательным присутствие триплоидов в популяциях диплоидной и тетраплоидной кукурузы.

*Список литературы*

*Еналеева Н. Х., Тырнов В. С.* Цитологическое проявление элементов апомиксиса у линии кукурузы АТ-1 и ее гибридов // Апомиксис у растений : состояние проблемы и перспективы исследований. Саратов, 1994. С. 57–59.

*Еналеева Н. Х., Тырнов В. С., Хохлов С. С.* Выделение зародышевых мешков покрытосеменных растений путем мацерации тканей // Цитология и генетика. 1972. Т. 6, № 5. С. 439–441.

Куприянов П. Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. Саратов, 1989. 160 с.

Тырнов В. С., Еналеева Н. Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272, № 3. С. 254–259.

Юдакова О. И., Гуторова О. В., Беляченко Ю. А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений : учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. Саратов, 2012. 44 с.

Enaleeva N. Ch., Tyrnov V. S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn // Maize Genetics Cooperation. Newsletter. 1997. № 71. P. 74–75.

Cooper J. L., Birchler J. A. Developmental impact on trans-acting dosage effects in maize aneuploids // Genesis. 2001. Vol. 31, № 2. P. 64–71.

Lee E. A., Coe E. H., Darrah L. L. Genetic variation in dosage effects in maize aneuploids // Genome. 1996. Vol. 39, № 4. P. 711–721.

УДК 581.16 + 582.998

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ  
ГАМЕТОФИТНОГО АПОМИКСИСА В ПОПУЛЯЦИЯХ ВИДОВ  
*CHONDRILLA* L. НИЖНЕГО ПОВОЛЖЬЯ

**Ю. А. Полякова, Е. В. Угольников, А. С. Кашин, А. О. Попова**

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,  
Учебно-научный центр «Ботанический сад»  
410010, Саратов, ул. Академика Навашина  
E-mail: kashinas2@yandex.ru*

Показано, что растения пяти исследованных видов (*C. juncea*, *C. graminea*, *C. canescens*, *C. brevirostris* и *C. latifolia*) характеризуются высокой степенью дефектности пыльцы (60–80%) и наличием цитозембриологических маркерных признаков гаметофитного апомиксиса. Это указывает на высокую вероятность их способности к семенному воспроизводству путём апомиксиса. Установлено, что частота обнаружения таких признаков существенно варьирует по годам и на межпопуляционном уровне. Выявлено, что *C. ambigua* является, скорее всего, половым видом, так как характеризуется фактически отсутствием дефектной пыльцы и мегагаметофитов с признаками апомиксического развития элементов.

**Ключевые слова:** гаметофитный апомиксис, цитозембриологические маркерные признаки, дефектность пыльцы, *Chondrilla*, Asteraceae.