

Цитометричне дослідження розвитку гаметофітів у хлібних злаків та їх гібридів

БЛАНКОВСЬКА ТАМАРА ПИЛИПІВНА

BLANKOVSKAYA. T. Ph. 2005: **Cytometrical investigation of developing gametophytes on cereals and their hybrids.** *Chorn. Botan. Journ.*, vol. 1, № 1: 99-104.

The volumes of cells, nuclei and nucleoli as well as nucleus – cytoplasm and nucleus – nucleolus ratio in developing male and female gametophytes from species and forms in the genera *Triticum* L., *Secale* L. and *Triticosecale* Wittmark as well as F₁ *T. aestivum* x *S. cereale* were determined. The changers of there indices during development gametophytes were regular. Some crises periods in development gametophytes as well as signs of normal or pathological course of gametogenesis of cereals have been determined. The hypothesis on connection between degree of the chromatin condensation and quantity of cytoplasm in female gametes been substantiated.

Keywords: cytometrical characteristics, male and female gametophytes, cereals, wheat-rye hybrid.

Ключові слова: цитометричні показники, чоловічий і жіночий гаметофіти, хлібні злаки, пшенично – житні гібриди.

Вступ

Розвиткові чоловічого та жіночого гаметофітів (пилку та зародкового мішка) хлібних злаків присвячена велика кількість робіт, в тому числі – монографій [БАТЫГИНА, 1978; МОДИЛЕВСКИЙ, ОКСИЮК и др., 1958; ОРЕЛ, 1972]. Але й досі залишаються нез'ясованими питання щодо ритму їх формування, зрілості під час запилення, випадків аномального розвитку і стерильності, періодів, в яких вони найбільш чутливі до різних чинників тощо. Особливо це стосується віддалених гібридів і мутантів.

Як відомо, віддалена гібридизація і мутагенез відіграють суттєву роль у створенні вихідного матеріалу для природного і штучного доборів. Тому вирішення зазначених питань має як теоретичне, так і практичне значення.

Для виявлення закономірностей розвитку генеративних структур велике значення мають кількісні показники. Одним з методів, які дозволяють визначити такі показники, є цитометрія.

Метою даного дослідження було виявити особливості розвитку і функціонування генеративних структур у віддалених гібридів, амфідиплоїдів та мутантів у порівнянні з вихідними видами і виділити ознаки, які характеризують нормальний або патологічний перебіг цих процесів.

Методика досліджень

Досліджували різновікові пиляки і зав'язі рослин видів з роду *Triticum* L. [ДОРОФЕЕВ, ФИЛАТОВА, МИГУНОВА, 1979]: *T. monosocum* L. (2n = 14), *T. dicocum*

(Schrack) Schuebl. ($2n = 28$), *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ($2n = 28$), *T. durum* Desf. ($2n = 28$), *T. aestivum* L. ($2n = 42$);

- виду із роду *Secale* L. – *S. cereale* L. ($2n = 14$);

- вторинних гексаплоїдних ($2n = 42$) та октаплоїдних ($2n = 56$) форм з роду *Triticosecale* Wittmak [Сечняк, Сулима, 1984];

- гібридів *T. aestivum* x *S. cereale*.

Пиляки і зав'язі на різних етапах розвитку фіксували сумішшю Навашина, доводили до парафіну за загальноприйнятою методикою [ПАУШЕВА, 1974]. Мікротомні зрізи пиляків і зав'язей завтовшки 8 мкм та 15-30 мкм відповідно забарвлювали бромфеноловим синім [ПАЛАМАРЧУК, ВЕСЕЛОВА, 1965].

Діаметри клітин, ядер та ядерць вимірювали за допомогою гвинтового окулярного мікрометра МОВ-1-15х при об'єктиві 40х мікроскопа МБИ – 3. Повторність вимірювань невакуолізованих і вакуолізованих мікроспор та двоклітинних пилкових зерен 25 – 30-ти кратна, а сформованих, зрілих і старих (через 5, 7 і 10 діб після початку цвітіння рослин) зародкових мішків – 15 - 20 – ти кратна.

Об'єм клітин, ядер і ядерць вираховували за формулою для кулі або еліпсоїда. Об'єм вегетативної клітини визначали як різницю між об'ємом двоклітинного пилкового зерна і об'ємом генеративної клітини.

Величину ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ЯЦС) вираховували за формулою:

$$\text{ЯЦС} = \frac{V_{\text{ядра}}}{V_{\text{цитоплазми}}};$$

де $V_{\text{цитоплазми}} = V_{\text{клітини}} - V_{\text{ядра}}$;

Величину ядерно – ядерцевого співвідношення (ЯЯС) обчислювали за формулою:

$$\text{ЯЯС} = \frac{V_{\text{ядра}} - V_{\text{ядерця}}}{V_{\text{ядерця}}} = \frac{V_{\text{ядра}}}{V_{\text{ядерця}}} - 1;$$

Одержані цифрові дані обробляли статистично [ПЛОХИНСКИЙ, 1980]. Різниця між порівнюваними величинами вважалась вірогідною при $P \leq 0,05 - 0,001$.

Результати досліджень

Дослідження показали, що найменші об'єми невакуолізованої мікроспори і її ядра були у *T. monosocum* і *S. cereale* (табл.), що і слід було очікувати виходячи з положення про кореляцію між набором хромосом і об'ємом ядра, з одного боку, та об'ємом ядра і цитоплазми – з іншого. Але така кореляція на даному етапі розвитку мікроспор спостерігалась не у всіх досліджуваних видів. Різниця ж між сортами *T. aestivum* і *T. durum* за цими показниками була достовірною.

При диференціюванні мікроспори (зміщення ядра на периферію клітини внаслідок утворення центральної вакуолі) у видів роду *Triticum* і роду *Secale* її клітина збільшується в 3 – 10 разів, ядро – в 1,5 – 3,0 рази, а ядерце в 3 – 9 разів.

Таблиця
Середній об'єм (мкм^3) клітини, ядра і ядерця мікроспор та двоклітинного пилку
Middle volumes (mcm^3) of microspores' s and bicellular pollen's cell, nucleus and nucleolus

Вид, сорт	Мікроспора											
	невакуолізована				вакуолізована				Двоклітинний пилко			
	вегетативна клітина		ядерця		Ядро		ядерця		вегетативна клітина		генеративна клітина	
	клітина	ядро	ядерця	клітина	Ядро	ядерця	клітина	ядро	ядерця	клітина	ядро	ядерця
<i>T. monosocum</i>	3953 ±173	337 ±30	19 ±2	30073 ±2995	1617 ±117	96 ±8	48809 ±2651	2242 ±140	159 ±19	1328 ±73	441 ±44	36 ±2
<i>T. timopheevii</i>	4579 ±332	677 ±61	22 ±1	26129 ±853	901 ±45	65 ±5	41667 ±1801	1489 ±125	89 ±6	1885 ±162	490 ±41	58 ±4
<i>T. durum</i> сорт Янгарна	5577 ±192	315 ±15	14 ±1	16098 ±388	531 ±21	17 ±1	38192 ±880	676 ±39	53 ±3	1157 ±83	273 ±14	12 ±1
сорт Парус	6466 ±378	776 ±118	26 ±2	34812 ±1457	1327 ±91	132 ±12	90769 ±3448	4083 ±340	297 ±16	2715 ±144	1016 ±63	89 ±4
<i>T. aestivum</i> сорт Безоста 1	5693 ±215	638 ±34	22 ±2	55884 ±2313	2008 ±119	190 ±8	101933 ±2895	3079 ±210	292 ±31	2719 ±426	1021 ±67	97 ±6
сорт Миронівська 808	7162 ±292	1077 ±93	37 ±2	35299 ±1679	1714 ±93	134 ±14	114916 ±5755	4281 ±373	369 ±20	4275 ±452	1208 ±89	135 ±6
<i>S. cereale</i>	3827 ±203	398 ±18	20 ±2	16980 ±710	763 ±68	56 ±4	39371 ±412	1263 ±79	107 ±6	1392 ±88	467 ±38	44 ±3
<i>Triticosecale</i>	7374 ±340	1270 ±130	39 ±2	61490 ±1672	3223 ±198	267 ±14	128836 ±582	5103 ±360	469 ±14	3638 ±242	1749 ±124	104 ±7
F_1 <i>T. aestivum</i> x <i>S. cereale</i>	4231 ±218	458 ±46	16 ±2	26521 ±2306	713 ±102	25 ±3	не утворюється					

У гексаплоїдній формі роду *Triticosecale* ядрце збільшується у 6,8 разу, а у F₁ *T. aestivum* x *S. cereale* – лише в 1,6 разу. Отже за нормального розвитку мікроспори об'єм її ядра збільшується меншими темпами, ніж ядрця. Внаслідок цього показник ЯЯС зменшується.

Характерною рисою аномальних вакуолізованих мікроспор F₁ *T. aestivum* x *S. cereale* є високе значення ЯЯС, яке спричинене депресією ядрцевого організатора. Такі мікроспори далі не розвиваються. Таким чином, величина ЯЯС у вакуолізованій мікроспорі є критерієм за прогнозування можливості її подальшого розвитку.

Веgetативна і генеративна клітини пилкового зерна, які утворились внаслідок диференціюючого мітозу мікроспори, розрізняються за об'ємом ядра і ядрця (табл.). У вегетативній клітині вони в середньому для досліджуваних видів в три рази більші, ніж в генеративній.

Слід відмітити, що і в двоклітинному пилковому зерні, як і в мікроспорах рослин поліплоїдного ряду видів роду *Triticum*, об'єм ядра не завжди корелює з набором хромосом. На цих етапах розвитку пилку об'єм ядра, ймовірно, відбиває функціональний стан клітин і інтенсивність метаболізму в них.

Подібне спостерігається і в зародковому мішку хлібних злаків. Вже на ценоцитній стадії його ядра розрізняються за об'ємом: халазальні ядра крупніші за мікропілярні.

Встановлено, що розміри ядер клітин зародкового мішка у різних видів і сортів злаків розрізняються. Розрізняються вони також і в залежності від умов вирощування. У зв'язку з цим за порівняльних досліджень визначали між'ядерне співвідношення – відношення об'єму ядер клітин зародкового мішка до об'єму ядра яйцеклітини. Виявилось, що це співвідношення неоднакове в різні періоди розвитку зародкового мішка. В сформованому зародковому мішку співвідношення об'ємів ядер клітин – яйцеклітина : синергіда : центральна клітина : антипода складає у *T. aestivum* - 1,0 : 0,6 : 1,8 : 0,7; у *S. cereale* – 1,0 : 0,6 : 1,6 : 0,9; у гексаплоїдній формі із роду *Triticosecale* – 1,0 : 0,5 : 2,0 : 1,2; У зрілому зародковому мішку – відповідно - 1,0 : 0,3 : 2,5 : 2,0; 1,0 : 0,3 : 3,2 : 2,3; 1,0 : 0,3 : 3,7 : 2,8. Як видно, у гексаплоїдній формі з роду *Triticosecale* це співвідношення відрізняється від такого у пшениці і жита. Можливо цей дисбаланс є однією з причин негативних явищ в його ендоспермі.

При диференціюванні клітин зародкового мішка об'єм ядрець змінюється не зовсім відповідно до зміни об'ємів ядра. Внаслідок цього величина ЯЯС в клітинах зрілого зародкового мішка вища, ніж сформованого. Особливо це стосується синергід. За старіння зародкового мішка ядра і ядрця його клітин, особливо антипод, збільшуються, зростає також величина ЯЯС.

Виявлена нами закономірність співвідношення об'ємів ядер і ядрець клітин зародкового мішка в процесі його розвитку дозволяє вірогідно розпізнавати сформований і зрілий зародковий мішки. Це може бути використано у ряді біологічних досліджень, зокрема при роботі з віддаленими гібридами.

Встановлено, що у F₁ *T. aestivum* x *S. cereale* зародковий мішок, як правило, дегенерує ще до цвітіння рослин. У F₂ цих гібридів співвідношення об'ємів ядер клітин зародкового мішка перед цвітінням рослин залишається майже таким, як в сформованому зародковому мішку. Середній об'єм ядер антипод у ньому менший за об'єм ядра яйцеклітини через те, що не відбулась політенізація хромосом. Такі зародкові мішки не життєздатні. Тому політенізацію хромосом в клітинах антипод слід визнати критичною подією в розвитку зародкового мішка хлібних злаків.

У різнохромосомних видів роду *Triticum* паралелізм між об'ємом ядра і числом хромосом спостерігається лише в яйцеклітині. У роді *Triticosecale* такий паралелізм спостерігається не завжди: у деяких гексаплоїдних форм ядро яйцеклітини більше, ніж у октаплоїдних. Виявлено також, що у форм *T. aestivum* з цитоплазматичною чоловічою

стерильністю об'єм ядер яйцеклітини і центральної клітини зародкового мішка менший, ніж у фертильних аналогів.

У зв'язку з недостатньою вивченістю антиподального комплексу зародкового мішка злаків проведені дослідження, які показали, що належний фізіологічний рівень цього комплексу у різних видів роду *Triticum*, а також у різних сортів *T. aestivum* досягається відповідним співвідношенням кількості та розмірів його клітин.

Слід відмітити, що в деяких зародкових мішках стерильного аналога *T. aestivum*, рослин гексаплоїдних форм *Triticosecale*, які виростили з дуже дрібного насіння, а також октаплоїдних форм, антиподи зовсім не ділились. В зрілих зародкових мішках їх було всього три. Оскільки антиподи відіграють важливу роль в синтезі і транспорті речовин [ШМАРАЄВ, 1988], їх кількість не може вплинути на розвиток зародкового мішка. Тому поділ антипод слід віднести до одного з критичних періодів в розвитку зародкового мішка.

Нормальне функціонування антиподального комплексу пов'язане не тільки з кількістю клітин в ньому, але й з їх фізіологічною активністю, ступенем політенізації хромосом, який позначається на об'ємі ядра, ядерця і клітини антипод.

Порівняльне дослідження антиподального комплексу у різнохромосомних форм із роду *Triticosecale* і *T. aestivum* показали, що кількість клітин у гексаплоїдних форм *Triticosecale* більша, ніж у октаплоїдних, але менша, ніж у *T. aestivum*. Середні розміри ядер і ядерця антипод у гексаплоїдних форм менші, ніж у октаплоїдних і у *T. aestivum*.

Сумарний об'єм ядер і ядерця усіх клітин антиподального комплексу зародкового мішка 42- і 56- хромосомних форм майже не розрізняється і в два рази менший, ніж у *T. aestivum*. Величина ядерно-ядерцевого співвідношення в клітинах антипод гексаплоїдних форм менша, ніж у октаплоїдних, що свідчить про їх вищу фізіологічну активність.

Таким чином, порівняно з *T. aestivum* у обох форм тритікале пригніченим є як процес поділу клітин антипод, так і їх диференціювання.

Кількість антипод варіює в залежності від положення квітки в колоску і колоска в колосі; вона зменшується в напрямку від верхньої частини колоса до нижньої; в середніх квітках колоска майже в два рази менше антипод, ніж в зовнішніх.

Звертали увагу на стан хроматину (ступінь його конденсації) в клітинах чоловічого та жіночого гаметофітів. Це питання цікавить ембріологів [БАННИКОВА, ХВЕДЫНИЧ, ШПИЛЕВАЯ И ДР., 1985], з ним, зокрема, пов'язують неоднакову швидкість об'єднання спермію з яйцеклітиною і центральною клітиною зародкового мішка за подвійного запліднення, а також різну тривалість дозрівання зиготи і зачатка ендосперму.

Наші дослідження показали, що спостерігається зв'язок між величиною ядерно – цитоплазматичного співвідношення (відношення об'єму ядра до об'єму цитоплазми) і станом хроматину в клітині. Під час розвитку чоловічого гаметофіту хлібних злаків ця величина закономірно змінюється. Вона найбільша в генеративній клітині і сперміях (в цих клітинах хроматин дуже конденсований) і найменша у вегетативній клітині, в якій хроматин деконденсований. З реорганізацією структури хроматину у вегетативному ядрі пилкового зерна під час його активного функціонування, що доведено мікрофлюориметричним методом [ШУЛАЕВ, 1987], ми пов'язуємо описану нами вперше [БЛАНКОВСКАЯ, ВОРОБЬЕВ, 1974] появу ліпідних включень у цьому ядрі.

В клітинах жіночого гаметофіту стан хроматину різний: у полярних ядрах хроматин деконденсований сильніше, ніж в ядрі яйцеклітини; при цьому величина ядерно – цитоплазматичного співвідношення в яйцеклітині більша, ніж в центральній клітині.

З наведених фактів можна зробити висновок, що різниця в стані хроматину, швидкості об'єднання гамет, а також тривалості дозрівання зиготи і зачатка ендосперму у квіткових рослин пов'язана з кількістю цитоплазми в жіночих статевих

клітинах, і що запліднені яйцеклітина і центральна клітина являють собою своєрідні гетерокаріони, в яких швидкість деконденсації хроматину ядра спермію залежить від кількості і якості цитоплазми.

Висновки

1. Об'єм клітин, ядер і ядерець та їх співвідношення закономірно змінюються під час розвитку чоловічого та жіночого гаметофітів у представників родів *Triticum* L., *Secale* L. та *Triticosecale* Wittmak.
2. Цитометричні показники, як правило, не корелюють з набором хромосом виду, а відзеркалюють функціональний стан клітини.
3. Віддалені гібриди можуть бути моделлю для визначення критичних періодів розвитку гаметофітів в родині *Poaceae* Burnhart.
4. Обґрунтована гіпотеза щодо ступеня конденсованості хроматину ядер чоловічих і жіночих гамет у зв'язку зі співвідношенням об'ємів ядра і цитоплазми.

Список літератури

- Банникова В. П., Хведьнич О. А., Шпилева С. П. и др. Половые клетки и оплодотворение у покрытосеменных и водорослей. – Киев: Наукова думка, 1985. – 220 с.
- Батыгина Т. Б. Хлебное зерно: Атлас. – Л.: Наука, 1987. – 102 с.
- Бланковская Т. Ф., Воробьев А. И. О липидных включениях в пыльце злаков // Цитология. – 1974. – Т. XVI, № 7. – С.113-117.
- Дорофеев В. Ф., Филатова А. А., Мигунова Э. Ф. и др. Культурная флора СССР. – Т. 1 Пшеница. – Л.: Колос, 1979. – 348 с.
- Модилевский Я. С., Оксенок П. Ф., Худяк М. И., Дзюбенко Л. К., Бейлис-Вырова Р. А. Цитоэмбриология основных хлебных злаков. – Киев: Изд-во АН УССР, 1958. – 336 с.
- Орёл Л. И. Цитология мужской цитоплазматической стерильности у кукурузы и других культурных растений. – Л.: Наука, 1972. – 86 с.
- Паламарчук И. А., Веселова Т. Д. Учебное пособие по ботанической гистохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1965. – 108 с.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1974. – 288 с.
- Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. – М.: Изд-во МГУ, 1980. – 150 с.
- Сечняк Л. К., Сулима Ю. Г. Тритикале. – М.: Колос, 1984. – 317 с.
- Шмараев И. Г. Ультраструктура антипод зародышевого мешка *T. aestivum* L. в связи с их функцией // Актуальные вопросы ботаники в СССР: Тез. докл. VIII делегат. съезда ВБО. – Алма-Ата, 1988. – С.372.
- Шулаев В. К. Структура хроматина клеток мужского гаметофита в связи с их функциональной активностью: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Кишинёв, 1987. – 18 с.

Рекомендує до друку

А. П. Орлюк

Отримано 16.05.2005.

Адреса автора

Т. Ф. Бланковська
Одеський національний університет
ім. І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2,
65026, Одеса
Україна

Author's address:

T. Ph. Blankovskaya
Odessa I. I. Mechnikov
State University
Dvoryanska St., 2
65026, Odessa
Ukraine