

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І.І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Методичні вказівки
до великого спеціального практикуму

Розділ

**«Визначення життєздатності пилку
та зародкового мішка»**

*для студентів спеціальності «біологія»
спеціалізації «генетика і молекулярна біологія»
усіх форм навчання*

О д е с а
«Одеський національний
університет»
2012

**Методичні вказівки до великого спеціального практикуму. Розділ
«Визначення життєздатності пилку та зародкового мішка».**

Для студентів спеціальності «біологія», спеціалізації «генетика і молекулярна біологія» усіх форм навчання.

Автор:

Т.Г. Алексєєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І.І. Мечникова

Рецензенти:

С.Г. Коваленко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки ОНУ імені І.І. Мечникова

С.О. Ігнатова, доктор біологічних наук, зав. лабораторією культури тканин Південного національного центру рослинництва УААН

Відповідальний редактор:

В.М. Тоцький, доктор біологічних наук, професор

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету ОНУ.
Протокол № 2 від 4.10.2011 р.

© Алексєєва Т.Г., 2012

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2012

Розвиток пилку у нормі і за патології

Розвиток чоловічого гаметофіту у покритонасінних відбувається за єдиним планом і складається з ряду процесів, кожен з яких є результатом попереднього та причиною наступного. Утворенню власне чоловічого гаметофіту – пилкового зерна – передує процес мікроспорогенезу, який включає у себе обособлення археспоріальних клітин пиляка, їх розвиток, проходження процесу мейозу, формування тетрад мікроспор та їх вивільнення із спільної калозної оболонки тетради.

За першого поділу мікроспори виникають велика вегетативна та невелика генеративна клітини, за другого – із генеративної клітини розвиваються два спермії. Поділ генеративної клітини відбувається або у пилковому зерні, або у пилковій трубці. В залежності від цього формується двох- або трьохклітинний пилочок.

Розрізняють біологічну (пилочок є носієм чоловічих статевих клітин (гамет)) та генетичну (чоловіча гамета пилку є носієм батьківського генетичного матеріалу) ролі, які виконує пилочок покритонасінних рослин. Під час проростання пилкового зерна воно та пилкова трубка є біологічно цілісною системою, що пристосована для забезпечення доставки сперміїв до клітин зародкового мішка.

За формою пилочок може бути округлим, еліптичним, видовженим, трикутним та ін. Будова, розміри та форма пилку є систематичними ознаками, які є постійними для кожного виду та адаптованими до того чи іншого способу переносу пилку. Кількість пилку у тичинках різних видів сильно варіює – від незначної до дуже великої кількості. Зазвичай квітки продукують значно більшу кількість пилку, ніж та, якої достатньо для забезпечення нормального розвитку насіння. Утворення великої кількості пилку гарантує запліднення насінних зачатків та забезпечує великий запас генетично різноманітних чоловічих гамет, що сприяє селективності запліднення.

Життєздатність пилку у різних рослин різна. У одних видів пилочок швидко втрачає свою життєздатність й здатність проростати на приймочці, у інших пилочок зберігається більш-менш тривалий період часу. Наприклад, у більшості злаків пилочок є життєздатним 1-3 дні, а у деяких видів роду *Tulipa*, пилочок зберігає життєздатність до 400 днів. Збереження пилком життєздатності протягом більш-менш тривалого періоду, звичайно, дуже залежить від умов його зберігання.

Найбільш сприятливими умовами для зберігання пилку є низька температура та помірна вологість. У деяких рослин при заморожуванні до -190

°C пилок зберігає життєздатність до 9 років. Висунуто припущення, що при -190 °C пилок може зберігатися необмежено довго.

Високий відсоток вуглекислого газу за умови зберігання пилку на сухому льоду збільшує життєздатність пилку, у той час як зберігання його у чистому кисні несприятливе для збереження життєздатності. Було показано, що такі речовини, як яечний білок, тальк та казеїн сприяють збереженню здатності пилку до проростання. Незважаючи на те, що пилок, який дуже довго зберігали, є нездатним до проростання на штучному живильному середовищі (*in vitro*), при запиленні таким пилком приймочок спостерігали досить великий відсоток утворення насіння. Вважають, що втрачені при зберіганні пилку речовини відновлюються *in vivo*.

Навички визначення життєздатності пилку та зародкового мішка вкрай необхідні за проведення гібридизації рослин та аналізу розвитку генеративних структур гібридів та мутантів.

У звичайних для даної рослини зовнішніх умовах майже весь пилок, що утворився у пиляках, є нормальним та фертильним. Морфологічно він виглядає більш менш однорідним, хоча однорідність ця може бути лише зовнішньою. Під впливом несприятливих зовнішніх умов (погоди з надмірним пониженням чи підвищенням температури та вологості), під впливом штучної дії різними реагентами та фізичними факторами нормальний розвиток та будова пилку може порушуватися, що призводить до появи стерильного пилку, якому властива деформація чи дегенерація ядер, клітин та цитоплазми. Ті ж самі явища зустрічаються і за розвитку пилку гібридів, апоміктів, поліплоїдів, хромосомних аберрантів і мутантів, а також при виникненні роздільностатевих квіток, вегетативному розмноженні, вівіпарії й партенокарпії та чоловічої цитоплазматичної стерильності.

За наявності значної стерильності пилку у більшому чи меншому ступені знижується плодючість рослин, так як недостатня кількість нормального пилку не може забезпечити повністю запліднення в усіх насінних зачатків і зумовити розвиток усіх насінних зачатків у насіння. Стерильність пилку у більшості випадків пов'язана з порушенням правильності проходження мейозу при мікроспорогенезі. Особливо значна кількість мейотичних порушень спостерігається за віддаленої гібридизації.

Відомі прямий і непрямі методи визначення життєздатності пилку. Прямим методом є проведення штучного запліднення досліджуваним пилком приймочок відповідних квіток і отримання насіння. До непрямих методів відносять усі інші, які засновані на аналізі морфології, біохімічних властивостей пилку чи його здатності проростати на штучному середовищі.

Оформлення протоколів дослідів

Записати тему та мету експерименту, вказати його номер та дату виконання

Вказати вид(и) рослин, з гаметофітами якого (яких) буде провадитися робота. Усі препарати (чашки Петрі) повинні мати етикетки, на яких чітко записана уся необхідна інформація (вид рослини, метод, прізвище студента, дата).

Дані аналізу стану пилку (зародкового мішка) занести до таблиці і навести відповідні розрахунки.

Вказати можливі причини отриманих результатів, сформулювати висновки

Матеріали та обладнання

Окрім реактивів чи барвників, які використовуються для проведення аналізу життєздатності чи фертильності гаметофітів, необхідне таке обладнання:

- Біологічні мікроскопи
- Дистильована вода
- Скляні та дерев'яні палички
- Окуляр-мікрометр МОВ – I – 15×
- Пінцети
- Піпетки
- Предметні та покривні скельця
- Препарувальні голки
- Покривні скельця
- Чашки Петрі
- Фільтрувальний папір

ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЧОЛОВІЧОГО ГАМЕТОФІТУ

Життєздатність пилку і його фертильність

Прийнято розрізняти життєздатність і здатність до запліднення пилкових зерен. Життєздатність пилкових зерен – це здатність чоловічого гаметофіту до росту на відповідних тканинах маточки, а запліднююча здатність, або зіготичний потенціал пилкового зерна – здатність його викликати повне запліднення. Здатність до запліднення пилкових зерен ще називають фертильністю. Головною морфологічною ознакою фертильності є наявність у пилкових зернах сформованих чоловічих гамет (сперміїв).

Серед методів випробування життєздатності пилку в селекційних роботах основне значення має метод пророщування пилку в штучному живильному середовищі і спостереження за проростанням пилку безпосередньо на рильцях маточки, а також методи фарбування, що рекомендуються для свіжозібраного пилку. Для визначення фертильності пилкових зерен використовують два методи: ацетокарміновий і йодний. Найбільш надійне визначення життєздатності та фертильності дають методи *in vivo*. Для порівняльних оцінок можна застосовувати і ті, які засновані на реакціях забарвлення.

Оцінка життєздатності пилку на приймочках запилених квіток

Для достовірної оцінки життєздатності пилку безсумнівне значення має спостереження над його проростанням безпосередньо на рильцях запилених квіток.

З цією метою квітки через 1-2 доби після запилення фіксуються. При фіксації у квітки віддаляється оцвітина пінцетом чи ножицями. Якщо для вивчення використовується різний пилок, то маточки різних комбінацій схрещування фіксуються в окремих пробірках.

Перед вивченням верхню частину стовпчика з рильцем відрізають ножицями або відщипують пінцетом. Для того, щоб пилкові трубки можна було легко розрізати серед сосочків приймочки, проводять фарбування метиленовим синім. Розчин готують у дистильованій воді з концентрацією приблизно від 0,01 до 0,1%. В результаті фарбування пилкові зерна і трубки ясно виділяються серед сосочків приймочки.

Методи визначення життєздатності пилку у вологих камерах (Ван-Тигема, Транковського)

Метод вологої камери Ван-Тигема

Камера Ван-Тигема складається з предметного скла, до якого за допомогою вазеліну прикріплюють скляне кільце діаметром близько 1,5 см і висотою 7-8 мм. На дно камери поміщають невелику краплю води, а верхній край кільця змащують вазеліном. Потім на нижню поверхню покривного скла за допомогою скляної палички наносять краплю живильного середовища для пророщування пилку. Для посіву пилку плодових рослин зазвичай беруть концентрації розчину сахарози – від 5 до 40 %. Точну концентрацію встановлюють експериментально для кожної досліджуваної культури. На краплю живильного середовища висівають пилок.

Пилок набирають на кінчик препарувальної голки або пінцета і обережно струшують на поверхню краплі. При посіві пилку слід уникати занурення голки

в краплю розчину. Будучи розпорошеними по поверхні краплі, пилкові зерна знаходяться в більш однорідних умовах і розташовуються майже в одній площині, внаслідок чого полегшується спостереження під мікроскопом. Потрібно намагатися, щоб у межах однієї краплі було розсіяно близько 100 пилкових зерен (густий посів сприятливо впливає на проростання пилку). Після посіву покривне скло перевертають краплею вниз і накривають їм скляне кільце так, щоб скло щільно прилягало до країв кільця, змазаних вазеліном. Крапля з посіяним пилком повинна перебувати у висячому положенні посередині, не стикаючись з краями камери, інакше вона розтікається (рис. 1).

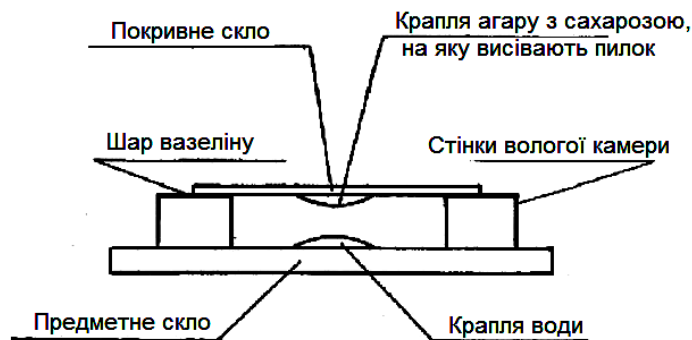


Рис. 1. Будова камери Ван-Тигема

Наявність краплі води на дні такої герметичної камери забезпечує підтримку в ній необхідної вологості. На приклеєній до предметного скла паперовій етикетці записують необхідні відомості: походження пилку, концентрація розчину, дата і час посіву, прізвище студента.

Метод вологої камери Д.А. Транковського

При посіві пилку за методом Д.А. Транковського, який набув останнім часом широкого застосування, посів проводиться у краплі живильної суміші, яка нанесена на предметне скло, після чого скельця з висіяним пилком поміщаються на підставки у вологу камеру – чашки Петрі. (Досвід показав, що краплі з живильним середовищем можна наносити прямо на внутрішню сторону кришки чашки Петрі, без предметних скелець).

Ще однією модифікацією цього методу є занурення предметних скелець у стаканчик з робочою сумішшю такого складу: 1 % розчин агару на дистильованій воді з додаванням хімічно чистої сахарози (концентрація сахарози може бути 5 %, 10 або 15 %, залежно від досліджуваної культури). Після занурення на верхній поверхні утворюється тоненький шар агару, на який зручно провадити посів пилку, з нижньої поверхні предметного скельця зайвий шар розчину стирають серветкою. Скельця укладають на дерев'яні підставочки

на дно чашки Петрі. Під підставочки для зволоження кладеться змочений водою фільтрувальний папір. Чашки закривають кришками. Вологі камери з посіяним пилок тримають в затемненому місці.

Пилок проростає цілком задовільно при температурі від 12 °С до 24 °С (оптимальна температура +18-20 °С). У мікроскоп пилок розглядають зазвичай через добу після посіву, але при температурі +20-24 °С для проростання буває достатньо 4-5 годин. Камеру або чашку Петрі розташовують на предметному столику мікроскопа, розглядають пророслий пилок і підраховують пророслі і непророслі пилкові зерна. До уваги приймаються лише пилкові зерна, що знаходяться в межах краплі. Пилок, потрапивши в живильний розчин, набрякає і стає округлішим. За цією ознакою ці пилкові зерна легко відрізнити від пилових зерен, що опинилися на сухій частині скла. Відсоток пророслих пилових зерен визначають не менше, ніж в 5-и полях зору, шляхом підрахунку в кожному полі зору пророслих і не пророслих пилових зерен. Обчислюють відсоток проростання, заповнюють відповідну таблицю.

Таблиця 1

Визначення життєздатності пилку за методом Д.А. Транковського

Вид рослини	***					Середній відсоток проростання пилку
	Поле зору					
Стан пилових зерен	1	2	3	4	5	
<i>Кількість пророслих</i>						
<i>Кількість непророслих</i>						
<i>Пророслі у кожному полі зору, %</i>						

Метод випробування життєздатності пилку шляхом посіву в штучному середовищі має істотний недолік: пилок проростає в умовах, різко відмінних від природних. Внаслідок цього отримані результати можуть більш-менш сильною мірою відрізнитися від проростання того ж пилку на приймочках запилених квіток. Однак додавання до цукрового розчину (0,0005 - 0,001% борної кислоти, агар-агару) або введення в краплю відокремленої від маточки приймочки рослини того ж ботанічного виду трохи наближає до природних умов, але повністю усунути зазначений недолік не може.

Методам вологої камери, на жаль, властиве певне заниження наслідків. Вони не можуть бути застосовані у роботі з рослинами, пилок яких погано проростає на штучному середовищі.

Біохімічні методи визначення життєздатності пилку **(методи Шардакова, Діакону)**

Життєздатність пилку – це його здатність проростати на приймочці маточки за наявності усіх необхідних сприятливих умов. Зрозуміло, що життєздатний (живий) пилок – дуже активний фізіологічно, а нежиттєздатний – фізіологічно неактивний. Базуючись на цьому, розробили велику кількість методів визначення життєздатності пилку, але жоден з них не є універсальним або таким, що придатен для будь-яких видів рослин.

Метод В.С. Шардакова

Метод базується на тому, що життєздатний пилок містить у великій кількості фермент пероксидазу, а тому легко дає забарвлену сполуку за дії реактивів, які містять бензидин. Нежиттєздатний пилок не містить пероксидази, а тому не забарвлюється.

Для проведення дослідження життєздатності пилку в окремих склянках з темного скла готують чотири розчини.

1. 0,20 г бензидину основного в 100 мл 50%-го розчину етилового спирту;
2. 0,15 г нафтолу в 100 мл 50%-го розчину етилового спирту;
3. 0,25 г натрію вуглекислого в 100 мл дистильованої води;
4. 0,3% розчин перекису водню.

Безпосередньо перед використанням розчини (1, 2 і 3) змішують у невеликих рівних об'ємах. Цю суміш розчинів і 4-й розчин наливають в окремі крапельниці. Пилок поміщають на предметне скло і піпеткою додають краплю суміші розчинів (1, 2, 3) і через одну хвилину додають краплю розчину 4. Перемішують скляною паличкою і накривають покривним склом.

Спостереження проводять відразу після нанесення краплі розчину 4. Якщо численні бульбашки кисню, що виділяються, будуть заважати вивченню препарату, то їх видаляють підняттям покривного скла. Живий пилок забарвлюється в яскраво-рожевий або темно-червоний колір завдяки наявності пероксидази, а мертвий залишиться безбарвним або жовтуватим. Підрахунки проводять не менше, ніж у 5-х полях зору мікроскопу, заповнюють таблицю.

Визначення життєздатності пилку за методом В.С. Шардакова

Вид рослини	***					Середній відсоток життєздатного пилку
Стан пилкових зерен	Поле зору					
	1	2	3	4	5	
<i>Забарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Незабарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Життєздатні у кожному полі зору, %</i>						

Для свіжозібраного пилку цей метод дає задовільні результати, але для пилку, який зберігався, результати виходять дещо завищені.

Метод П.І. Діакону

Життєздатність пилку за методом П.І. Діакону оцінюють за ступенем активності сукциндегідрازی. Відомо, що дихання клітин найбільш пов'язане з життєвими процесами і здійснюється за участю ферментів дегідраз. У разі припинення дихання можна говорити про загибель клітин.

Зміну активності сукциндегідрازی можна легко визначити за допомогою безбарвного розчину хлориду трифенілтетразола. За наявності активної сукциндегідрازی хлорид трифенілтетразола відновлюється до формазану, що має червоний колір. У разі припинення життєвих процесів формазан не утворюється, забарвлення клітин не відбувається.

Для проведення досліджень потрібно виготовити буферний розчин Серенсена з рН 7.17 за прописом: для 10 мл фосфатного буферного розчину беруть 7 мл $1/15$ М розчину $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та додають до нього 3 мл $1/15$ М розчину KH_2PO_4 .

На предметне скло наносять краплю буферного розчину та додають трохи досліджуваного пилка. Витримують 4-5 хвилин, після цього обережно фільтрувальним папером відсмоктують буферний розчин і додають 1-2 краплі розчину хлориду трифенілтетразолу. Після цього препарат накривають покривним склом і ставлять у термостат на 30 хвилин при температурі 37 °С.

Після завершення експозиції препарат досліджують під мікроскопом, визначаючи забарвлення пилкових зерен не менше, ніж у п'яти полях зору і заповнюють наведену нижче таблицю:

Визначення життєздатності пилку за методом П.І. Діакону

Вид рослини	***					Середній відсоток життєздатного пилку
	Поле зору					
Стан пилкових зерен	1	2	3	4	5	
<i>Забарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Незабарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Життєздатні у кожному полі зору, %</i>						

Червоне забарвлення пилкових зерен вказує на їх життєздатність. Мертві пилкові зерна зовсім не забарвлюються та залишаються жовтими.

Метод прижиттєвих барвників (за В.Н. Юрцевим)

Метод заснований на наявності активної вибіркової поглинальної здатності у протоплазми живих клітин пилку і відсутності її у протоплазми нежиттєздатного пилку. Жива протоплазма майже не поглинає прижиттєвий барвник і не забарвлюється, а нежиттєздатна – інтенсивно забарвлюється. Метод дає добрі результати при визначенні життєздатності пилку злаків, який майже не проростає на штучних середовищах. Замість еритрозину можна використовувати метиленовий синій у тій самій концентрації або інші не токсичні барвники.

Готують два розчини

1. 1: 5000 розчин хімічно чистого еритрозину на дистильованій воді
2. Фосфатний буферний розчин Серенсена з рН 7,17. (Пропис надано у методиці, запропонованій П.І. Діакону)

На предметне скло наносять краплю свіжого буферу і насипають трохи пилку. Перемішують паличкою, додають краплю розчину еритрозину і знову перемішують. Через 2-5 хвилин накривають покривним склом. Ще через 5 хвилин (не пізніше, ніж через 15-20 хвилин) підраховують кількість забарвлених і незабарвлених пилкових зерен в 5 полях зору мікроскопу, заповнюють таблицю.

Визначення життєздатності пилку за методом В. Н. Юрцева

Вид рослини	***					Середній відсоток життєздатного пилку
Стан пилкових зерен	Поле зору					
	1	2	3	4	5	
<i>Забарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Незабарвлені пилкові зерна</i>						
<i>Життєздатні у кожному полі зору, %</i>						

Каріометричне визначення життєздатності пилку злакових культур (метод Т.П. Бланковської)

Головною перевагою методу, запропонованого Т.П. Бланковською, є можливість визначення життєздатності пилку на ранніх етапах його розвитку. Як морфологічну ознаку беруть об'єм ядра та ядерця на стадії одноядерного пилкового зерна, вираховують відношення об'єму ядра до об'єму ядерця.

З метою аналізу з колосу досліджуваного злаку (на стадії трубки) обережно беруть колосок, з колоска – один пиляк, якій розміщують в краплині води на предметному скельці і накривають покривним склом.

Злегка придавлюють (дерев'яною паличкою) і визначають, на якій стадії знаходяться пилкові зерна. Для вимірів підходять одноядерні диференційовані вільні мікроспори, ядро в яких вже зміщено до оболонки за рахунок утворення центральної вакуолі.

Під світловим мікроскопом при об'єктиві 40× за допомогою гвинтового окуляр-мікрометра МОВ – І – 15×, закріпленого на тубусі мікроскопу, визначають лінійні розміри ядер та ядерця. Об'єм ядер та ядерця визначають в мкм³ за формулою:

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b^2,$$

де a – велика, b – маленька напіввісі (за еліпсоїдної форми), або

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3, \text{ де } r \text{ – радіус (за кулястої форми, зручно використовувати для}$$

визначення об'ємів ядерця).

Ядерно-ядерцеве співвідношення (ЯЯС) обчислюють за формулою:

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

де $V_{\text{ядра}}$ і $V_{\text{ядерця}}$ є середнім арифметичним відповідних показників, отриманих для 10-15 вимірених одноядерних пилок зерен. Життєздатним вважають пилок, у якого ядерно-ядерцеве співвідношення знаходиться у межах від 2 до 16.

Ацетокарміновий метод визначення фертильності пилок зерен

Матеріал фіксують в оцтовому алкоголі (3:1), а потім пилові зерна відразу забарвлюють ацетокарміном.

У фертильних пилових зерен зерниста цитоплазма і спермії пофарбовані в густий карміново-червоний колір. Стерильні пилові зерна майже не забарвлюються ацетокарміном або забарвлення виглядає нерівномірним. Їх вміст часто відходить від оболонки і знаходиться на різних стадіях відмирання. Сперміїв в таких пилових зернах немає (рис. 2).

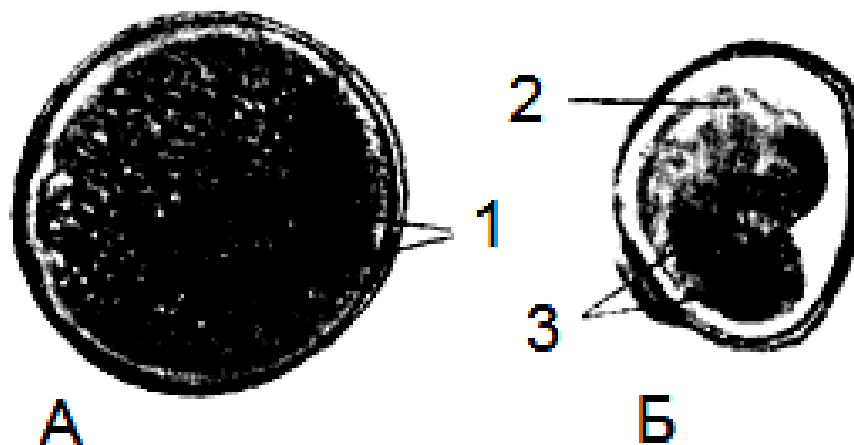


Рис. 2. Пилкові зерна пшениці після забарвлення ацетокарміном: А – фертильне, Б - стерильне пилове зерно: 1 – спермії; 2 – вміст пилового зерна, що відокремився від оболонки, 3 – вегетативне і генеративне ядра, що дегенерують.

Використовують ще один варіант **ацетокармінового методу**. Фіксують суцвіття або квітки зі зрілим пилом у фіксаторі Карнуа. Тривалість фіксації коливається від 30 хвилин до декількох годин. Матеріал промивають і зберігають у 80%-му розчині етилового спирту. Після зберігання пиляк викладають на предметне скло і розчавлюють у краплі ацетокарміна. Прибравши зайві тканини, препарат накривають покривним склом і обережно підігрівають на спиртівці.

Можна визначити фертильність пилку ацетокарміновим методом без попередньої фіксації, тобто використовуючи свіжі пиляки. Незважаючи на

варіації методики, підрахунки проводять не менш, ніж у п'яти полях зору мікроскопу та заповнюють таблицю.

Таблиця 5

Визначення фертильності пилку ацетокарміновим методом

Вид рослини	***					Середній відсоток фертильного пилку
	Поле зору					
Стан пилкових зерен	1	2	3	4	5	
<i>Фертильні пилкові зерна</i>						
<i>Нефертильні пилкові зерна</i>						
<i>Фертильні у кожному полі зору, %</i>						

Визначення фертильності пилку йодним методом

У деяких культур пилкові зерна мають товсту екзину, крізь яку важко побачити спермії при забарвленні ацетокарміном. Тоді застосовують йодний метод, в його основі лежить визначення крохмалю за допомогою йодної реакції. Фертильні і стерильні пилкові зерна відрізняються за вмістом крохмалю. Зазвичай фертильне пилкове зерно повністю заповнено крохмалем, а стерильне не має його зовсім або містить сліди.

Йодний розчин готують за рецептом Грама: 2 г йодиду калію розчиняють в 5 мл дистильованої води при нагріванні. Потім у розчин додають 1 г металевого йоду, доводять до 300 мл і зберігають у склянці з помаранчевого скла.

Зрілі пиляки розкривають двома голками на предметному склі, змочують йодним розчином і, видаливши зайві тканини, накривають покривним склом. Під мікроскопом можна легко відрізнити фертильні пилкові зерна за темно-фіолетовим (майже чорним) кольором. Стерильні пилкові зерна залишаються незабарвленими, так як не містять крохмалю або мають його сліди. Незабарвленими залишаються і оболонки пилкових зерен. Застосування цього методу є обмеженим, тому що пилкові зерна, які несуть спермії, не завжди є фертильними, навіть якщо вони містять крохмаль.

Після проведення забарвлення, препарат розглядають під мікроскопом, заповнюють таблицю:

Визначення фертильності пилку йодним методом

Вид рослини	***					Середній відсоток фертильного пилку
Стан пилкових зерен	Поле зору					
	1	2	3	4	5	
<i>Заповнені крохмалем</i>						
<i>Незаповнені крохмалем</i>						
<i>Фертильні у кожному полі зору, %</i>						

ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЖІНОЧОГО ГАМЕТОФІТУ

Розвиток різних типів зародкового мішка

Зародковим мішком чи жіночим гаметофітом, називають статеве покоління покритонасінних рослин. Зародковий мішок розвивається в центральній частині сім'ябруньки (нуцелусі), де спочатку виокремлюється археспоріальна клітина. У залежності від виду рослин археспоріальних клітин може бути декілька. Внаслідок розвитку археспоріальної клітини утворюється материнська клітина мегаспор (мегаспороцит). Мегаспороцит ділиться мейотично, утворюючи 4 гаплоїдних клітини (тетраду мегаспор), з яких у переважній більшості видів розвивається одна (решта дегенерують).

Після відокремлення функціонуючої мегаспори протягом формування зародкового мішка відбуваються 3 послідовних синхронних мітотичних поділи його ядер. Їх кількість зростає в прогресії 1:2:4:8, і вони порівну розподіляються між полюсами зростаючого зародкового мішка. Після третього мітотичного поділу на мікропілярному кінці зародкового мішка утворюються три клітини яйцевого апарату (яйцеклітина та дві клітини-супутниці – синергіди), у протилежному (халазальному) – три клітини-антиподи. У центрі зародкового мішка знаходиться центральна клітина, що містить два полярних ядра. Антиподальні клітини зазнають подальших поділів, формуючи антиподальний комплекс, до складу якого можуть входити до 100 клітин. Характерною ознакою клітин антиподального комплексу злаків є політенізація їх хромосом.

Подальша еволюція цього, так званого нормального, типа зародкового мішка полягала у виникненні зародкового мішка, що утворюються двома або чотирма мегаспорами, скороченні числа мітотичних поділів до 2 або 1 і в зміні розподілу ядер. Різні поєднання цих змін зумовили виникнення декількох типів зародкового мішка, які відрізняються як числом ядер (4, 8, 16), клітинних груп і

полярних ядер (1, 2, 4, 7—14), так і числом клітин в групах (наприклад, яйцевий апарат може складатися з 1, 2, 3, 5 і 7 клітин), а також іншими ознаками.

У зрілому зародковому мішку відбувається подвійне запліднення, тобто злиття одного спермія з яйцеклітиною, а другого – з полярними ядрами центральної клітини, внаслідок чого розвиваються зародок ($2n$) і ендосперм ($3n$).

У нормальних умовах інтактні зародкові мішки мають вищезазначений тип будови та є фертильними. Але під впливом різних факторів, як природних (несприятлива погода), так і штучних (вплив низької чи високої температури, рентген-опромінення, різні реагенти та т. ін.), а також у гібридів, поліплоїдів, гаплоїдів і мутантів, за вегетативного розмноження чи партенокарпії нормальний для даного виду хід утворення і будови зародкового мішка може порушуватися, що призводить до появи стерильних зародкових мішків, причому в одних випадках це пов'язано з порушеннями правильності ходу мейозу при мегаспорогенезі, а в інших – не пов'язано з ними. Досить часто одночасно з дегенерацією зародкових мішків дегенерують і насінні зачатки, в яких вони утворюються, що призводить до виникнення пусого зморщеного насіння, і, відповідно, до зниження або повної втрати фертильності рослин, у яких під впливом тих чи інших чинників відбулися порушення у нормальному розвитку і будові зародкового мішка.

На відміну від досліджень, об'єктами яких є чоловічий гаметофіт – пилок, вивчення жіночого гаметофіту стикається з певними методичними складнощами. Першою незручністю є важкість доступу до схованого у тканинах зав'язі зародкового мішка. Також важливе значення має значно менша кількість зародкових мішків навіть у багатонасінних квітках порівняно з наявністю в них величезної кількості пилкових зерен.

Таким чином, визначення життєздатності жіночого гаметофіту у більшості випадків провадиться лише прямим методом – а саме, запиленням квіток життєздатним і фертильним пилом. Тим не менш, для злаків розроблено непрямий метод визначення життєздатності зародкового мішка

Визначення життєздатності зародкового мішка хлібних злаків (за Т.П. Бланковською)

Даний метод заснований на тому, що в молодих, щойно сформованих зародкових мішках (фаза колосіння рослин) середній об'єм ядра антипод є меншим, ніж об'єм ядра яйцеклітини. Перед цвітінням рослини у життєздатних зародкових мішках це відношення об'ємів ядер антиподи/яйцеклітина значно перевищує 100 %.

Таким чином, для визначення життєздатності зародкового мішка злаків на постійному мікротомному препараті зрілого зародкового мішка визначають об'єм ядра яйцеклітини та об'єми ядер усіх антиподальних клітин. Для вимірів використовують гвинтовий окуляр-мікрометр МОВ – І – 15× при окулярі 40×, формули розрахунків наведено у розділі «Каріометричне визначення життєздатності пилку злакових культур (метод Т. П. Бланковської)». Вираховують середнє арифметичне для об'ємів ядра усіх антипод і розраховують відношення середнього об'єму ядер антипод до об'єму ядра яйцеклітини одного і того ж зародкового мішка. Якщо отриманий показник перевищує 100 %, то зародковий мішок є життєздатним.

Список рекомендованої літератури

1. Барабин А.И., Залывская О. С. Селекция растений: Лабораторный практикум. – Архангельск: Изд-во АГТУ, 2004. – 71 с.
2. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятое А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Основы микротехнических исследований в ботанике. Справочное руководство. – М.: Каф.высших растений МГУ, 2000. – 127 с.
3. Бланковская Т.Ф. Способ Бланковской Т.Ф. определения жизнеспособности пыльцы зерновых культур. – А.с. СССР № 972590 // Бюлл. Госкомизобретений. – 1982. - № 47.
4. Бланковская Т.Ф. Способ определения жизнеспособности зародышевого мешка у хлебных злаков. – А.с. СССР № 1273024 // Бюлл. Госкомизобретений. – 1986б. - № 44.
5. Гидова Є.М., Керефова М.К. Большой практикум: методические указания: Нальчик: Каб.-Балк. Ун-т, 2008. – 39 с.
6. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений. – Самара, 2003. – 275 с.
7. Самигуллина Н.С., Кирина И.Б. Практикум по генетике: Учебное пособие. – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2007. – 211 с.
8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
9. Тоцький В.М. Генетика. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.
10. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.1. Генеративные органы цветка. – Под. ред. Т.Б. Батыгиной. – С.-Пб.: Мир и семья, 1994. – 514 с.
11. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.1. Репродуктивные системы. – Под. ред. Т.Б. Батыгиной. – С.-Пб.: Мир и семья, 2000. – 642 с.
12. Юрцев В.Н. Руководство к лабораторно-практическим занятиям по цитологической и эмбриологической микротехнике. – М., 1961. – 64 с.

Навчальне видання

Алексєєва Тетяна Григорівна

Методичні вказівки до великого спеціального практикуму.

Розділ

«Визначення життєздатності пилку

та зародкового мішка»

*Для студентів спеціальності «біологія»,
спеціалізації «генетика і молекулярна біологія»
усіх форм навчання*

Видано в авторській редакції

Підп. до друку 20.05.2012. Формат 60x84/8.
Гарн. Таймс. Умов.-друк. арк.0,7. Тираж 25 прим.
Зам. № 439

Видавець і виготовлювач
**Одеський національний університет
імені І.І. Мечникова**

65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво ДК № 4215 від 22.11.2011 р