

Лабораторная р а б о т а 8. РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕНЕРАТИВНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

Система семенного размножения цветковых растений представлена совокупностью генеративных органов и комплексом биохимических и физиологических приспособлений, обеспечивающих образование спор и гамет, опыление и двойное оплодотворение, образование плодов и семян. Стабильность развития и функционирования этой системы обеспечивается генотипом, а изменчивость её признаков – варьированием экспрессии генов под влиянием условий среды обитания. Эволюционно значимым фактором изменчивости генеративной сферы является радиоактивное излучение, действие которого составляет основу видообразования.

Биологические эффекты облучения могут быть обнаружены на разных частях генеративной системы. В лабораторных условиях удобным объектом для изучения последствий облучения является пыльца. Пыльцевые зерна имеют небольшие размеры (10 – 200 мкм). Их тонкие оболочки – экзина и интина – легко проницаемы для радиоактивных излучений. Ядра пыльцы имеют гаплоидный набор хромосом, что значительно облегчает выявление рецессивных мутаций.

Пыльца образуется в результате следующих друг за другом предмейотических митозов, приводящих к образованию материнских клеток пыльцы, и мейоза, после которого в тычинках появляются микроспоры, т.е. одноядерная пыльца. Поскольку и митоз, и мейоз являются радиочувствительными процессами, то облучение цветков, пыльников или пыльцы сказывается на качестве пыльцы.

Для оценки радиоустойчивости пыльцы используются следующие критерии и меры оценки радиобиологического эффекта:

- 1) выживаемость пыльцы после облучения, которая определяется по проценту пыльцевых зерен, проросших на искусственных питательных средах;
- 2) интенсивность роста пыльцевых трубок при прорастивании облучённой пыльцы на искусственной питательной среде, измеряемой в миллиметрах за единицу времени;
- 3) торможение роста пыльцевой трубки, которое определяется по значению дозы, при которой длина пыльцевой трубки достигает 50% по сравнению с контролем;
- 4) завязываемость семян после опыления облучённой пыльцой.

Процент завязавшихся семян находится в прямой зависимости от дозы облучения и оплодотворяющей способности пыльцы, именуемой фертильностью. Фертильность зависит от условий формирования пыльцы и в первую очередь – от поведения хромосом в мейозе, которое может нарушаться при облучении. Формирование полноценных семян при опылении цветков облученной пыльцой нарушается при дозе 50 Гр и более.

Действие радиации на генеративную систему можно также оценивать по развитию зародышевого мешка и семязачатка, зародыша и эндосперма семени, по всхожести и энергии прорастания семян.

При радиоактивном облучении генеративной системы растений может быть получено потомство с широким спектром изменчивости вегетативных и генеративных органов. Это явление может быть использовано в практической селекции.

З а д а н и е 1. Влияние облучения на фертильность пыльцы

Определение фертильности основано на окрашивании цитоплазмы фертильной пыльцы ацетокармином или йодистым калием в темный цвет. Стерильные пыльцевые зерна не окрашиваются, потому что в них нарушен синтез крахмала и образование спермиев.

Фертильность можно определять в полевых и лабораторных условиях, используя свежесобранную или зафиксированную пыльцу из контрольных и облученных цветков. Для этого цветки или соцветия со зрелыми пыльниками фиксируются в фиксаторе Карнуа

(см. работу 5). Экспозиция обработки составляет 4–8 часов. Зафиксированный материал может храниться в 70%-ном спирте.

Цель работы: определить влияние облучения на фертильность пыльцы.

Материалы и оборудование: измененный фиксатор Карнуа, 70%-ный спирт; ледяная уксусная кислота; ацетокармин, йодистый калий или раствор Люголя; микроскоп; препаровальные иглы и пинцеты; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; зафиксированные цветки или соцветия облученных и необлученных растений.

Выполнение работы: 1. Аккуратно извлечь пыльник из цветка, положить на предметное стекло, нанести на него каплю красителя.

2. Раздавить пыльник в капле красителя, постукивая препаровальной иглой или спичкой, удалить ткани пыльника и оставить для окрашивания на 20–30 мин.

3. Произвести настройку микроскопа (см. работу 5). Для анализа пыльцы можно использовать объектив 10/0,20 и окуляр 10^x или 15^x.

4. Поместить препарат под микроскоп. В 25 полях зрения микроскопа подсчитать число фертильных и стерильных пыльцевых зерен. Результаты записать в таблицу 10.

5. Определить фертильность пыльцы облученных и необлученных цветков. Сделать выводы и записать их в тетрадь.

Т а б л и ц а 10. Анализ фертильности пыльцы

Поле зрения микроскопа	Фертильные пыльцевые зерна, шт.	Стерильные пыльцевые зерна, шт.	Всего пыльцевых зерен, шт.	Фертильность, %
Облученные цветки				
1-25				
Необлученные цветки				
1-25				

З а д а н и е 2. Влияние облучения на жизнеспособность пыльцы

Под жизнеспособностью пыльцы понимают её способность прорасти на рыльце пестика или на искусственных питательных средах.

Прорастание пыльцы происходит через проростковую пору наружной оболочки – экзины, при этом образуется пыльцевая трубка из внутренней оболочки микроспоры – интины и цитоплазмы вегетативной клетки пыльцы. В пыльцевую трубку перемещается генеративное ядро микроспоры и делится путем митоза, образуя два гаплоидных спермия. Прорастание пыльцы и образование пыльцевой трубки является приспособлением для доставки мужских гамет в зародышевый мешок, где происходит двойное оплодотворение у цветковых растений.

Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок контролируется системой генов, а также ингибируется различными неблагоприятными условиями внешней среды, в том числе высокими дозами радиационного излучения (2000–5500 Гр). Более радиостойчивой является мелкая пыльца.

Изучению влияния облучения на рост пыльцевых трубок, образование гамет и двойное оплодотворение уделяется большое внимание в радиобиологии, поскольку эти процессы связаны с семенной продуктивностью и сохранением видового постоянства растений. В частности, в семействе Лилейные установлено, что митотическое деление генеративного ядра полностью подавляется дозами около 250 Гр, а нарушение развития зародыша и эндосперма при опылении цветков облученной пыльцой отмечается при дозах 50 Гр. Это указывает на то, что образование гамет, оплодотворение и формирование семян являются радиочувствительными процессами.

В лабораторных условиях жизнеспособность пыльцы определяется на искусственных средах путем подсчета количества проросших пыльцевых трубок или по активности её ферментов.

Цель работы: определить влияние облучения на жизнеспособность пыльцы.

Материалы и оборудование: камера Ван-Тигема; микроскоп с осветителем и трансформатором; облученная и необлученная пыльца; покровные и предметные стекла; термостат; агар-агар; сахароза; бензидин основной; этиловый спирт, α - нафтол; углекислый натрий; перекись водорода; дистиллированная вода.

Выполнение работы: Метод 1. Жизнеспособность пыльцы можно определить в камере Ван-Тигема. 2. Для изготовления камеры от стеклянной трубки диаметром 10–12 мм обрезать кусочки длиной 5–8 мм и приклеить парафином в центр предметного стекла. Верхний срез трубочки смазать вазелином и внутрь камеры капнуть 1–2 капли воды.

2. Приготовить искусственную питательную среду. Для этого взять 1г агар-агара, поместить в колбу на 100 мл, прилить для набухания 5 мл воды. Через некоторое время долить воды до 100 мл, и после полного растворения агар-агара добавить 5–40 г сахарозы в зависимости от вида растения. 3. На покровное стекло нанести питательную среду и посеять пыльцу. 4. Накрыть камеру покровным стеклом так, чтобы питательная среда с пыльцой находилась внутри камеры. Поместить камеру в термостат при температуре 20–30° градусов для проращивания пыльцевых зерен. 5. Через час или большее время анализируют пыльцу под микроскопом. Проросшими считают пыльцевые зерна с длиной пыльцевой трубки не менее диаметра пыльцевого зерна. 6. Определить жизнеспособность пыльцы. Результаты анализа записать в таблицу 11 и сделать вывод о влиянии облучения на этот признак.

Т а б л и ц а 11. Анализ жизнеспособности пыльцы

Поле зрения	Количество проросших пыльцевых зерен, шт.	Количество не проросших пыльцевых зерен, шт.	Всего пыльцевых зерен, шт.	Жизнеспособность пыльцы, %
Облученная пыльца				
1-10				
Необлученная пыльца				
1-10				

Метод 2. Определение жизнеспособности пыльцы по методу В.С. Шардакова. Метод основан на выявлении фермента пероксидазы в жизнеспособных пыльцевых зернах. 1. Непосредственно перед работой приготовить четыре исходных раствора: а) 0,20 г бензидина основного растворить в 100 мл 5%-ного этилового спирта; б) 0,15 г α - нафтола растворить в 100 мл 50%-ного этилового спирта; в) 0,25 г углекислого натрия растворить в 100 мл дистиллированной воды; г) 0,3%-ный раствор перекиси водорода. 2. Смешать три первых исходных раствора в одинаковых объемах, нанести на предметное стекло и высыпать пыльцу. 3. Добавить на предметное стекло две капли перекиси водорода. Живая пыльца, содержащая пероксидазу, окрасится в ярко-розовый или темно-красный цвет. По интенсивности окраски или по её отсутствию судят о жизнеспособности пыльцы. 4. Сделать вывод по результатам опыта и записать в тетрадь.

Контрольные вопросы

1. Назовите преимущества пыльцы перед другими биологическими объектами при изучении радиобиологических эффектов.

2. Назовите критерии и меры оценки радиобиологических эффектов репродуктивной системы.

3. Как влияет опыление облученной пыльцой на оплодотворение и потомство?

4. Что такое фертильность пыльцы и как она определяется?
5. Какие красители используют для изучения фертильности пыльцы?
6. В какой мере облучение в опыте влияло на фертильность пыльцы?
7. Что такое жизнеспособность пыльцы и как её определяют ?
8. При каких дозах облучения подавляется прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок?
9. Как влияет облучение на прорастающую пыльцу?
10. Как изготовить камеру Ван-Тигема?
11. Как приготовить искусственную питательную среду?
12. Как выделить проросшие пыльцевые зерна?
13. Какое влияние оказало облучение на жизнеспособность пыльцы в опыте?
14. На чем основан метод определения жизнеспособности пыльцы В.С. Шардакова?