

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**СОХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ  
МЕТОДАМИ *IN VIVO* И *IN VITRO***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы  
направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Коробовой Елизаветы Валерьевны

Научный руководитель

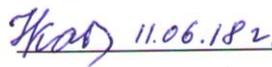
доцент кафедры генетики, к.б.н.

 Т.А.Алаторцева  
11.06.2018г.

Научный консультант

зав. отделом генетики

УНЦ «Ботанический сад», к.б.н.

 11.06.18г. А.Ю. Колесова

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., доцент

 11.06.18 О.И. Юдакова

Саратов 2018

**Актуальность темы.** Партеногенез – развитие семян из неоплодотворённой яйцеклетки, наряду с амфимиксисом достаточно широко распространённый тип размножения покрытосеменных растений. Наследственно обусловленная предрасположенность к апомиксису довольно часто встречается среди злаков. Особенности партеногенетического развития представляют интерес для генетиков и селекционеров, которые используют их для получения гаплоидов, гомозиготных линий, закрепления гетерозиса, поддержания хозяйственно ценных мутантных форм.

Многие отечественные и зарубежные ученые работают в направлении выявления апомиксиса у культурных растений и передачи им этого свойства от диких видов. К сожалению, результативность таких экспериментов, как правило, очень низкая. Подобное касается и кукурузы, некоторые партеногенетические линии которой являются уникальными. В связи с этим исследования, направленные на поиск ценных сельскохозяйственных форм растений с предрасположенностью к партеногенезу, являются актуальными и практически значимыми.

Наличие линий кукурузы с элементами апомиксиса в коллекции кафедральной лаборатории позволило провести такое исследование.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы заключалась в изучении возможности выявления и воспроизводства диплоидных и тетраплоидных линий кукурузы с высоким уровнем партеногенеза.

В задачи эксперимента входило:

1. Определить частоту и типы проявления полиэмбрионии у ди- и тетраплоидных партеногенетических форм кукурузы.
2. Оценить возможность использования показателей полиэмбрионии в качестве маркерного признака партеногенеза.
3. Изучить реакцию изолированных зародышей ди- и тетраплоидных партеногенетических форм кукурузы на процесс культивирования *in vitro*.

4. Оценить различия в способности формировать морфогенный каллус и у эксплантов разной ploидности.
5. Оценить перспективу использования культуры зрелых изолированных зародышей для сохранения и воспроизводства партеногенетических форм кукурузы разной ploидности.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись формы кукурузы, взятые из коллекции Отдела генетики УНЦ «Ботанический сад» г. Саратов, включающие формы с половым способом размножения и элементами апомиксиса.

Диплоидные формы:

1. АТ-1 – партеногенетическая линия кукурузы имеет склонность к автономному развитию яйцеклетки при задержке опыления
2. АТ-4 (17 вариантов) – получена на основе тетраплоида Тетра АТ-1 (результат полиэмбрионии типа  $2n-2n$ ).

Тетраплоидные формы:

3. Тетра АТ-1 (18 вариантов) – выделенна из гибридного потомства, полученного путём опыления тетраплоидной формы Крп-1 пыльцой АТ-1.
4. Тетраплоидная амфимиктичная форма Краснодарская, популяция -1 (Крп - 1). Получена из Краснодарского НИИ сельского хозяйства.

Зрелые зерновки проращивали на фильтровальной бумаге в кюветах. Препараты корешков для определения ploидности окрашивали ацетокармином согласно известной методике.

Зародыши вычлняли из зерновок и помещали на питательную среду щитком вниз по одному в каждую пробирку, содержащую 7 мл. питательной среды. Культивирование проводили в темноте при температуре  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Питательная среда содержала макро – и микроэлементы МС, витамины, агар – агар, а также сахарозу (10 мг/л, 20 мг/л, 30 мг/л) и 2,4-Д (0 мг/л; 2,0 мг/л, 3,0мг/л). Всего 9 возможных вариантов. Перед

автоклавированием рН среды доводили раствором NaOH до уровня 5.8 – 6.1.

Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей.

**Структура и объём работы.** Согласно цели исследования эксперимент состоял из двух этапов (*in vivo* и *in vitro*). Первый этап – это собственно отбор партеногенетических форм с возможно максимальной частотой проявления партеногенеза у исходных диплоидной и тетраплоидной, склонных к партеногенезу форм кукурузы. Второй – включал исследования, связанные с использованием метода культуры изолированных зародышей *in vitro*.

#### **Выявление полиэмбрионии у партеногенетических форм кукурузы разной плоидности**

Известно, что полиэмбриония может быть результатом партеногенеза, поэтому мы провели исследования по определению частоты возникновения близнецовости у названных генотипических форм (таблица 1).

Полиэмбрионы были выявлены в 12 из 17 изученных вариантов (всего 2948 семян), при этом их частота варьировала от 0,2 до 2 %. Всего обнаружено 22 полиэмбриона, из которых - 20 двоен и 2 тройни. Большая часть близнецовых проростков представлена диплоидами, хотя встречались близнецы и иной плоидности.

Таблица 1- Результаты проращивания зерновок диплоидной кукурузы линии АТ-4

№ варианта	Количество				
	зерновок	двоен		троен	
	шт.	шт.	%	шт.	%
452	536	1	0,2	0	0
461	346	1	0,3	0	0
477	214	2	0,9	0	0
424	128	1	0,8	0	0
478	181	2	1,1	1	0,6
426	94	1	1,1	0	0
470	80	0	0	0	0
428	99	2	2,0	0	0
461	239	2	0,8	1	0,4
528	151	3	2,0	0	0
528	151	3	2,0	0	0
486	160	2	1,3	0	0
526	142	0	0	0	0
458	128	2	1,6	0	0
394	50	0	0	0	0
567	101	1	1,0	0	0
435	126	0	0	0	0
449	173	0	0	0	0

При проращивании зерновок 18 вариантов линии Тетра АТ-1 (всего 3216 семян), как следует из таблицы 2, в 7 вариантах обнаружены двойни. У пятидвоен оба проростка были тетраплоидами ( $4n-4n$ ), у двух двоен один проросток был тетраплоидным (рисунок 1), а второй - диплоидным ( $4n-2n$ ).



Рисунок 1 – Митоз в корневом апексе тетраплодного проростка

Таблица 2 – Результаты проращивания зерновок тетраплоидной кукурузы формы Тетра АТ-1

№ варианта	Количество		
	зерновок		
	шт.		шт.
402	237	0	0
430	176	0	0
482	209	0	0
430	176	0	0
482	209	0	0
436	184	0	0
410	146	1	0,7
488	349	0	0
544	159	0	0
476	117	0	0
411	237	0	0
476	102	0	0
391	121	1	0,8
526	142	0	0
429	158	1	0,6
472	174	0	0
563	137	2	1,5
557	183	2	1,1

Мы считаем, что наличие полиэмбрионов с уменьшенной вдвое плоидностью может служить диагностическим признаком на предрасположенность к партеногенезу как у диплоидов, так и у тетраплоидов.

### **Изучение спектра морфогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы.**

В ходе эксперимента было установлено, что процесс развития зрелых зародышей кукурузы в условиях изолированной культуры *in vitro* происходит неоднозначно и во многом определяется временем года.

В весенний период развитие эксплантированных зародышей происходило следующим образом уже через трое суток от момента инокуляции, начиналось их прорастание, которое было аналогичным для эксплантов всех генотипических форм. В отсутствии в питательной среде фитогормонов у зародышей сначала развивались корешок и coleoptile, затем появлялись настоящие листья. Далее формировались обычные растения.

В процессе прорастания зародыша в районе щитка мог появиться раневой каллус, объём которого со временем увеличивался. Формирование каллусной массы иногда сопровождалось слабым ризогенезом.

В присутствии 2,4-Д, как это видно на рисунке 2, зародыши прорастали менее активно, видимо за счёт ауксина происходило ингибирование процессов корнеобразования, и растения формировались без корневой системы.



Рисунок 2 – Стадии прорастания зародышей на питательной среде, содержащей 2,4-Д: А – отсутствие каллусогенеза; Б – появление каллуса (К) на coleoptile

Проростки половой линии Крп-1 без корневой системы в пробирочной культуре погибали, не дав новообразований. Только у форм с наследственно обусловленной склонностью к апомиксису (АТ – 1; АТ - 4; №563 и № 557) спустя семь суток культивирования на среде с 2,4-Д на внешней и внутренней поверхности утолщающегося coleoptile можно было обнаружить появление глобулярных образований приблизительно диаметром 1мм.

Далее количество глобул увеличивалось, и как показано на рисунке 3, они становились хорошо заметными и напоминали «грозди». В дальнейшем, глобулы были способны к формированию либо исключительно ризогенного каллуса серого цвета, либо жёлтого морфогенного (эмбриогенного), который продуцировал в свою очередь большое количество эмбриоидов, проявляющих тенденцию к прорастанию.

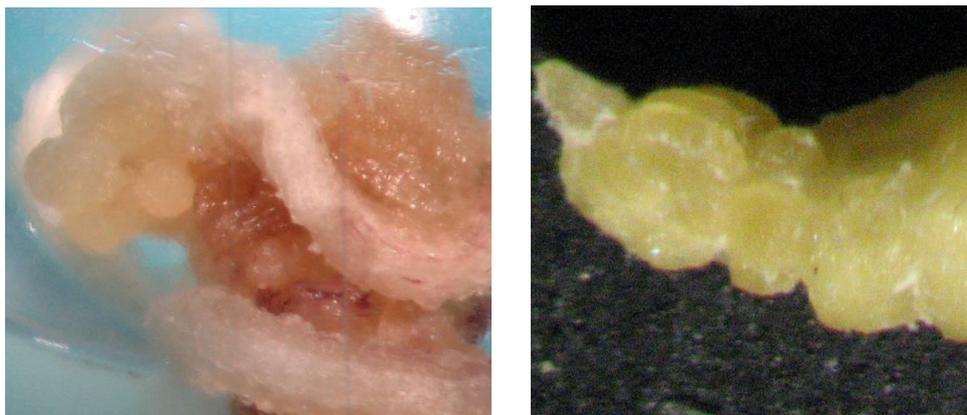


Рисунок 3 – Формирование ЭГК на колептиле прорастающего зародыша

### **Особенности развития изолированных зародышей диплоидных доноров на разных вариантах питательной среды.**

Из данных, представленных в таблице 3 следует, что экспланты линии АТ-1 и дигаплоида АТ – 4 оказались отзывчивыми на условия культивирования. Зародыши линии АТ-1 более активно формировали и глобулярные структуры и ЭГК. Частота появления глобулярных образований зависела от состава питательной среды и варьировала от 6,9 % на среде № 7 (2,4-Д- 0, мг/л, сахара 6%) до 36,3 % на среде № 3 (2,4-Д- 3,0 мг/л, сахара 2,0 %).

Однако не все зародыши, при прорастании которых формировались глобулы, были способны давать в дальнейшем морфогенный каллус, или эмбриоидогенные комплексы (ЭГК).

Таблица 3 – Результаты культивирования зрелых диплоидных зародышей на разных питательных средах

Гено тип доно ра	Признаки	Компоненты питательной среды, № варианта								
		сахароза 2,0%			сахароза, 4,0%			сахароза, 6,0 %		
		2,4-Д, мг/ л			2,4-Д ,мг/л			2,4-Д, мг/л		
		0	2,0	3,0	0	2,0	3,0	0	2,0	3,0
		№ 1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9
Частота встречаемости признака, %										
АТ-1	Проростки без корней	0	69,2	56,6	5,2	34,3	36,1	10,2	33,1	35,2
	Проростки с корнями	36,7	0	0	47,4	0	3,2	55,7	3,6	14,1
	Непроросшие зародыши	59,7	25,8	47,1	46,3	62,7	33,8	31,3	19,4	52,7
	Глобулы	0	29,9	36,3	0	14,3	10,2	0	11,9	19,2
	ЭГК	0	3,8	4,8	0	5,4	6,6	0	6,9	11,2
	Регенеранты	0	0	0	0	3,1	0	0	0	5,3
АТ -4	Проростки без корней	2,3	36,4	35,4	6,2	38,2	45,7	3,6	39,2	45,2
	Проростки с корнями	54,4	7,4	6,3	46,8	11,4	6,1	63,1	7,8	12,1
	Непроросшие зародыши	36,2	51,2	55,2	26,1	61,2	49,9	14,1	49,2	44,4
	Глобулы	0	34,3	24,3	0	2,7	25,2	0	7,8	11,2
	ЭГК	0	2,7	5,1	0	3,7	1,7	0	2,4	4,2
	Регенеранты	0	0	0	0	1,2	2,1	0	0	2,6

Частота появления ЭГК также изменялась в зависимости от состава среды от 0 % (на безгормональных вариантах с разным количеством сахарозы: №1, № 4 и № 7) до 11,2 % на среде №9 (2,4-Д- 3,0 мг/л, сахароза 6,0%). Максимум ЭГК приходится на вариант среды №9, который в некоторой степени соизмерим с другими вариантами (№6 и №8), включающих достаточно большие концентрации 2,4-Д (3,0 и 2,0 мг/л, соответственно) и сахарозы (4,0 и 6,0%, соответственно). Эмбриониды, входящие в состав ЭГК, были способны к более активному прорастанию на среде, содержащей ИУК и кинетин, тем не менее, на средах № 5 (2,4-Д-,0 мг/л, сахароза 2,0 %) и № 9 (2,4-Д- 3,0 мг/л, сахароза 6,0 %) в исходном пассаже могли появиться растения - регенеранты с частотой, соответственно, 3,1 % и 5,3 %.

Что касается зародышей формы АТ-4, то в целом, как говорилось и ранее, были характерны сходные морфогенетические тенденции, только частота образования, оказалась несколько ниже, чем для линии АТ-1. Например, появление глобулярных новообразований на проростках было отмечено на всех гормональных средах, от минимального значения 2,7 % (среда №5) до максимального – 34,3% (среда №2), хотя частота развития ЭГК составляла на разных средах с 2,4-Д от 1,7 % (среда № 6) до 5,1% (среда № 3).

Таким образом, можно заключить, индукция эмбриоидогенного каллуса, возможна лишь на средах с 2,4 –Д, но находится в большой зависимости от генотипических особенностей доноров.

#### **Реакция зародышей тетраплоидных форм кукурузы на условия культивирования *in vitro***

Для поиска форм, обладающих высоким морфогенетическим потенциалом *in vitro*, кроме выше названных диплоидных линий и их межлинейного гибрида, были выбраны также тетраплоидные гибридные формы (№ 563 и № 557), полученные скрещиванием Крп-1 с линией АТ – 1 (в качестве опылителя). Эксперимент с тетраплоидными зародышами проводился с использованием тех же девяти вариантов питательной среды. Данные результатов исследования представлены в таблице 4.

Контролем служила тетраполидная амфимиктичная форма Крп-1. При её культивировании можно было наблюдать на средах без регуляторов роста только прорастание зародышей, иногда, сопровождающееся появлением раневого каллуса со стороны щитка. В присутствии 2,4-Д в различных концентрациях сахарозы активно формировались глобулы, и от них далее – каллус неморфогенного свойства, Таким образом, линия оказалась не перспективной в плане формирования морфогенного каллуса (ЭГК) и, следовательно, для получения от неё растений - регенерантов.

Таблица 4 – Результаты культивирования зрелых зародышей тетраплоидных форм кукурузы на разных питательных средах

Генотип донора	Признаки	Компоненты питательной среды, № варианта								
		сахароза 2,0%			сахароза, 4,0%			сахароза, 6,0 %		
		2,4-Д, мг/ л			2,4-Д, мг/л			2,4-Д, мг/л		
		0	2,0	3,0	0	2,0	3,0	0	2,0	3,0
		№ 1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9
		Частота встречаемости признака, %								
№ 563	Проростки без корней	2,7	86,2	87,4	86,6	76,1	84,9	6,2	82,0	84,3
	Проростки с корнями	91,2	5,4	1,7	1,6	7,6	4,9	85,2	4,7	5,9
	Непроросшие зародыши	7,6	8,7	12,5	11,9	16,2	13,3	9,4	13,6	11,5
	Глобулы	0	16,1	25,2	0	34,5	36,4	0	23,4	17,8
	ЭГК	0	21,2	16,8	0	21,1	22,8	0	23,7	22,3
	Каллус	2,2	6,1	0	0	15,1	10,9	0	14,4	9,7
№ 557	Проростки без корней	9,2	92,3	81,2	81,1	84,9	89,4	3,8	85,7	87,5
	Проростки с корнями	80,3	3,1	1,6	1,6	4,1	0,4	83,4	1,3	1,2
	Непроросшие зародыши	12,4	5,8	18,2	18,3	13,2	11,6	15,3	13,4	12,1
	Глобулы	0	23,1	48,1	0	16,6	11,8	0	12,5	15,3
	ЭГК	0	4,3	15,2	0	15,8	14,2	0	17,3	22,4
	Каллус	0	17,2	6,1	6,1	18,2	17,1	0	11,9	10,2
Крп-1	Проростки без корней	3,1	82,6	14,8	15,5	85,1	83,6	3,8	85,9	85,9
	Проростки с корнями	89	4,5	4,8	6,1	1,6	1,4	87,3	5,3	4,3
	Непроросшие зародыши	6,8	18,7	23,6	24,4	14,5	16,3	9,7	11,2	10,6
	Глобулы	0	5,7	8,1	0	6,3	8,3	0	7,1	9,7
	ЭГК	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Каллус	12,1	0	3,9	4,2	9,6	10,7	0	9,2	11,5

Из результатов культивирования зародышей тетраплоидных гибридных апомиктичных форм № 563 и № 557, следует, что имело место варьирование частот образования как исходных глобулярных структур, так и ЭГК.

У формы № 563 на средах № 1 (2,4-Д- 0 мг/л, сахараза 2,0 %), № 4 (2,4-Д- 0 мг/л, сахараза 4,0 %) и № 7 (2,4-Д- 0 мг/л, сахараза 6,0 %) полностью отсутствовали процессы образования первичных глобул и ЭГК, которые могли бы косвенно указывать на перспективность этих сред для

индукции ЭГК. Достоверно более высокие частоты глобулообразования – 34,5% и 36,4 % были зафиксированы, соответственно на средах №5 (2,4-Д- 2,0 мг/л, сахара 4,0 %) и №6 (2,4-Д- 3,0 мг/л, сахара 4,0 %) и минимальное значение – 16,1% на среде №2 (2,4-Д- 2,0 мг/л, сахара 2,0 %).

Для зародышей генотипической формы № 557 также отмечалось колебание частот глобулообразования. При этом достоверно более высокие показатели были характерны для среды № 3 (2,4-Д- 3,0 мг/л, сахара 2,0 %) – 48,1%. Что касается формирования ЭГК, то шесть вариантов из испытанных девяти оказались в равной степени благоприятными для индукции морфогенного каллуса.

Таким образом, все исследованные формы кукурузы, имеющие наследственно обусловленную предрасположенность к партеногенезу *in vivo*, могли быть использованы в качестве доноров эксплантов для получения морфогенных каллусных штаммов.

Подводя итог проведённому исследованию, следует сделать заключение, что для выявления и сохранения форм кукурузы с предрасположенностью к партеногенезу может быть очень результативным сочетание методов *in vivo* и *in vitro*. Предрасположенность к партеногенезу у кукурузы *in vivo* коррелирует с высокой морфогенетической активностью и регенерацией *in vitro* и характерна как для диплоидных, так и тетраплоидных гибридов с амфимиктами. Создание новых партеногенетических форм культурных растений путём гибридизации может восполнить недостаток в исходном материале, необходимом для селекционеров. Благодаря использованию техники *in vitro* открываются перспективы для создания и сохранения, наряду с семенными коллекциями, коллекции регенерируемых каллусных штаммов партеногенетических линий и гибридов, большинство из которых в настоящее время уникальны.

## Выводы

1. Как диплоидные (АТ-1 и АТ-4), так и тетраплоидные формы (Тетра-АТ-1) кукурузы с наследственной предрасположенностью к партеногенезу проявляют склонность к полиэмбрионии. У диплоидных форм формируются двойни типов  $2n-2n$  и  $2n-n$ , а также тройни  $2n-2n-n$ ; у тетраплоидов – двойни типа  $4n-4n$  и  $2n-2n$ .

2. По проявлению полиэмбрионии у диплоидной (АТ-4) и тетраплоидной (Тетра - АТ-1) форм отсутствуют достоверные различия, их частоты составляют 0,2 – 2,0 % и 0,6 – 1,5 %, соответственно.

3. В культуре изолированных зародышей диплоидных и тетраплоидных партеногенетических форм кукурузы отмечается идентичный спектр морфогенетических процессов: на безгормональных вариантах питательной среды – образование зелёных проростков с корешками; на средах с 2,4-Д – формирование глобулярных структур и каллусогенез (ризогенный и морфогенный).

4. По морфогенетической активности и частоте образования эмбриоидогенных комплексов (ЭГК) тетраплоидная форма Тетра – АТ-1 (варианты № 563 и № 557) значительно превосходит диплоидные формы АТ-1 и АТ-4. Максимальные значения этих частот составляют у вариантов Тетра – АТ-1: 23,7 % и 22,4 %, у АТ-1 – 11,2 %, у АТ-4 – 6,1 %, соответственно.

5. Наличие полиэмбрионов с уменьшенной вдвое плоидностью может служить диагностическим признаком на предрасположенность к партеногенезу как у диплоидов, так и у тетраплоидов.

