

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра генетики

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ДЛЯ
ПОДГОТОВКИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА К ПОСАДКЕ *IN VIVO*
*И IN VITRO***

Автореферат бакалаврской работы
студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Сиденко Виктории Александровны

Научный руководитель

доцент кафедры генетики, к.б.н


8.06.19

Ю.А. Беляченко

Научный консультант

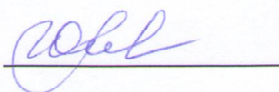
вед. биолог учебно-научной
лаборатории биотехнологии и
репродуктивной биологии


8.06.19

С.Н. Тимофеева

Заведующий кафедрой генетики,

д.б.н., доцент



О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Одну из важнейших задач в области растениеводства представляет собой получение высококачественного посадочного материала. Для его получения могут применяться различные селекционные подходы, основанные на использовании различных подходов и методов генетики, репродуктивной биологии и биотехнологии растений. Так, наряду с традиционными методами селекции и способами семенного воспроизводства, применяемыми для самого широкого круга объектов, в некоторых случаях на передний план выходят методы биотехнологии и использование метода культуры *in vitro*. Предпосевная подготовка посадочного материала является необходимым этапом в проведении работ в условиях *in vivo* и *in vitro*. Специфика данного этапа будет определяться особенностями культивируемых объектов, задачами работы и качеством посадочного материала.

Целью данной работы являлось исследование влияния химических и физических факторов на инициацию прорастания зерновок и рост проростков кукурузы в условиях *in vivo* и *in vitro*. К задачам нашего исследования относились следующие вопросы.

1. Оценка различных способов стерилизации семенного материала для проращивания в стерильных и нестерильных условиях;
2. Изучение влияния предобработки низкочастотным магнитным полем на набухание зерновок, их прорастание и рост проростков в нестерильных условиях, а также особенности инициации роста стерильной культуры в условиях *in vitro*.

Структура и объем работы. Работа изложена на 50 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 28 наименований.

Основное содержание работы.

В качестве объекта исследования использовалась кукуруза сортов Радуга, Пурпурная Саратовская (ПС) и линии АТТМ. Проращивание

зерновок в нестерильных условиях проводилось в специальных кюветах. Перед проведением эксперимента из початков исследуемой линии или сорта отбирались выровненные по форме и размеру зерновки, с типичными для данной формы морфологическими признаками, отмерялось необходимое количество зерновок и они взвешивались.

Эксперименты со стерильной культурой проводились в условиях ламинарного бокса с соблюдением всех необходимых условий асептики. Стерилизация эксплантов проводилась в несколько этапов, в соответствии с более строгими требованиями к стерильности материала при работе в рамках метода культуры *in vitro*. В качестве стерилизующих растворов использовали хлорсодержащие препараты:

1. «Белизна» (производитель: ООО «ГРИНФИЛД РУС», гипохлорид натрия 5-15%) в разведении 1:1; рабочий раствор готовили непосредственно перед применением;

2.«Domestos» (изготовитель: «Юнилевер Русь», Россия, <5% гипохлорид натрия).

В серии экспериментов с использованием препаратов «Максим» и «Белизна» (в разведении 1:1 и 1:2) с временем воздействия 5, 10 и 15 мин зерновки замачивались в стерильной дистиллированной воде на 3 суток.

В каждом варианте стерилизации с растворами, содержащими «Белизну» было выполнено 3 повторности по 15 зерновок в каждом варианте, с препаратом «Domestos» – 3 повторности по 50 зерновок.

Через 3 дня после начала проращивания учитывали количество проросших зерновок, количество инфицированных зерновок, характер поражения (бактериальное или грибное), длину coleoptилей и корней.

В экспериментах с предобработкой зерновок низкочастотным магнитным полем (МП) применялись следующие параметры воздействия: индукция 25 мТл, частоты – 3, 6 и 9 Гц, длительность экспозиции – 1 или 2 ч. Воздействию подвергались сухие и набухшие (предварительно замоченные) зерновки. Контрольные группы растений содержались в аналогичных

условиях, но не испытывали воздействия МП. В каждом варианте и повторности были использованы группы выровненных (по морфологическим признакам, размеру и массе) зерновок в количестве 50 шт.

На рисунке 1 приведены средние значения доли проросших зерновок и доли стерильных проростков при различных способах стерилизации материала. Наименьшее количество проростков было отмечено в контроле – 29%. Все варианты стерилизации характеризовались средними значениями данного параметра в пределах 65-71%. Все варианты стерилизации сопровождались повышением среднего значения доли стерильных проростков (95-98%) относительно контрольного уровня (89%).

По результатам статистической обработки с применением дисперсионного анализа, различия между контролем и всеми способами стерилизации достоверны в отношении доли проросших зерновок ($p \leq 0,02$; $F \geq 13$) и доли стерильных проростков ($p < 0,05$; $F \geq 8$). Между разными вариантами стерилизации различий по рассматриваемым параметрам не обнаружено, и все они могут быть рекомендованы к использованию.

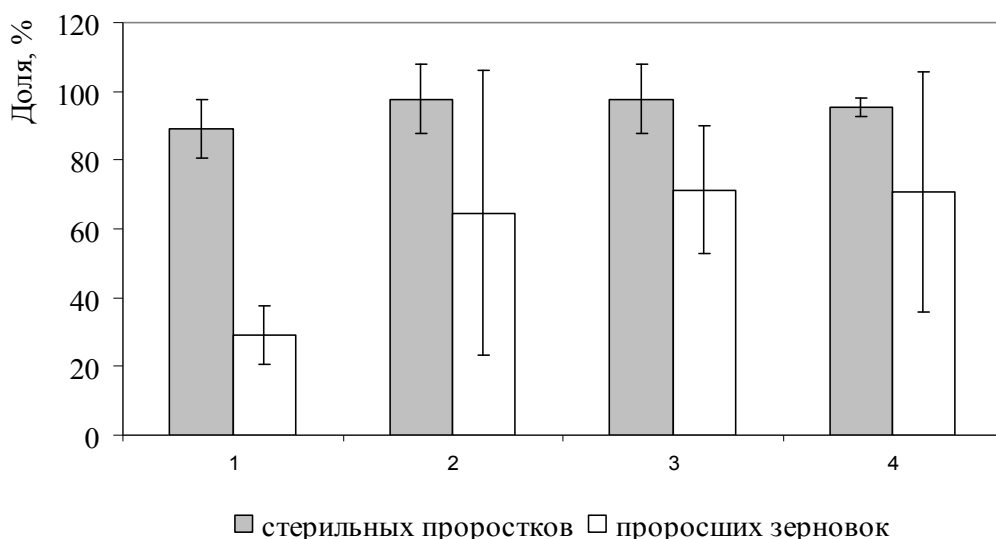


Рисунок 1 – Средние значения доли проросших зерновок и стерильных проростков кукурузы ПС в контроле (1), и воздействии стерилизующих растворов в течение 15 мин – «Белизны» в разведении 1:1 на сухие (2) и набухшие (3) зерновки, «Domestos» на сухие зерновки (4)

В наших экспериментах при использовании в качестве стерилизующего агента «Белизны» в разведении 1:1 через 3 суток проращивания инфицированных зерновок не обнаружено. При этом бóльшая продолжительность стерилизации (15 мин) способствовала более значительному угнетению роста проростков: длина корней уменьшалась на 14%, длина coleoptily – на 76%. Вариант стерилизации длительностью 5 мин сопровождался уменьшением длины корней на 13%, длины coleoptily – на 40% (относительно контроля). При воздействии раствора «Белизны» было отмечено изменение цвета корней (они становились белыми). Для растений в контроле была характерна антоциановая окраска корней.

В следующей серии экспериментов исследовались разные по длительности варианты предобработки раствором «Белизны» в разведении 1:1 и 1:2, а также коммерческим препаратом «Максим» (производитель – компания «Monsanto») при его разведении в соответствии с инструкцией производителя. На рисунке 2 представлены данные о средних значениях изменения массы набухших зерновок кукурузы сорта Радуга в опытных вариантах и контроле.

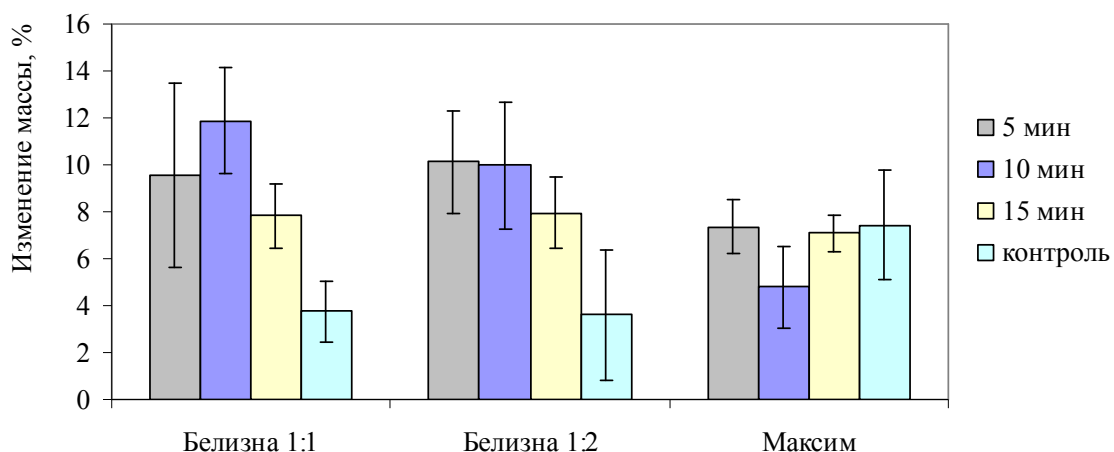


Рисунок 2 – Средние значения относительного изменения массы зерновок кукурузы сорта Радуга в результате их набухания после замачивания и предобработки различными стерилизующими растворами

Дисперсионный анализ подтверждает достоверность различий между контролем и вариантом воздействия «Белизной» в разведении 1:1 в течение 10 мин. Поскольку в данном случае масса зерновок после замачивания увеличивается очень значительно (более чем в три раза), можно сделать вывод, что данное воздействие способствует более эффективному набуханию зерновок. Причиной подобной закономерности может являться, в частности, повышение проницаемости покровов зерновки для воды.

На рисунке 3 приведены средние значения доли проросших зерновок в данной серии экспериментов. Достоверные различия с контролем были отмечены в варианте обработки препаратом «Максим» при выдерживании зерновок в течение 5, 10 и 15 мин ($p=0,007$; $F=25,6$). Предобработка данным препаратом способствует увеличению доли проросших зерновок, в среднем, на 45%.

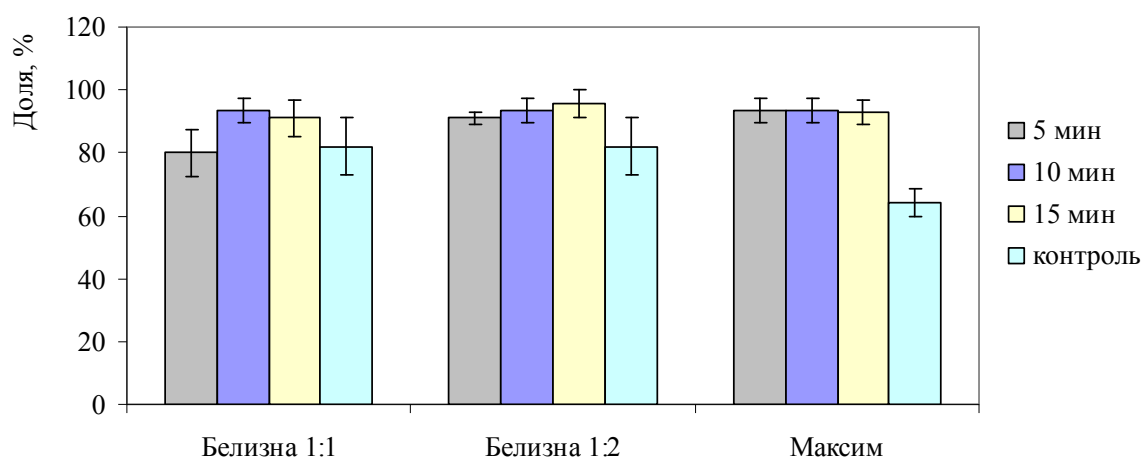


Рисунок 3 – Средние значения доли проросших зерновок кукурузы сорта Радуга в контроле и вариантах предобработки различными стерилизующими растворами

Средние значения доли стерильных проростков через трое суток с момента начала проращивания приводятся на рисунке 4. Достоверные различия при сравнении с контролем отмечены для вариантов воздействия «Белизной» в разведении 1:2 в течение 5, 10 ($p=0,002$; $F=50,4$) и 15 мин

($p=0,005$; $F=30,3$), а также препаратом «Максим» при обработке 5, 10 ($p=0,009$; $F=21,9$) и 15 мин ($p=0,007$; $F=26,2$).

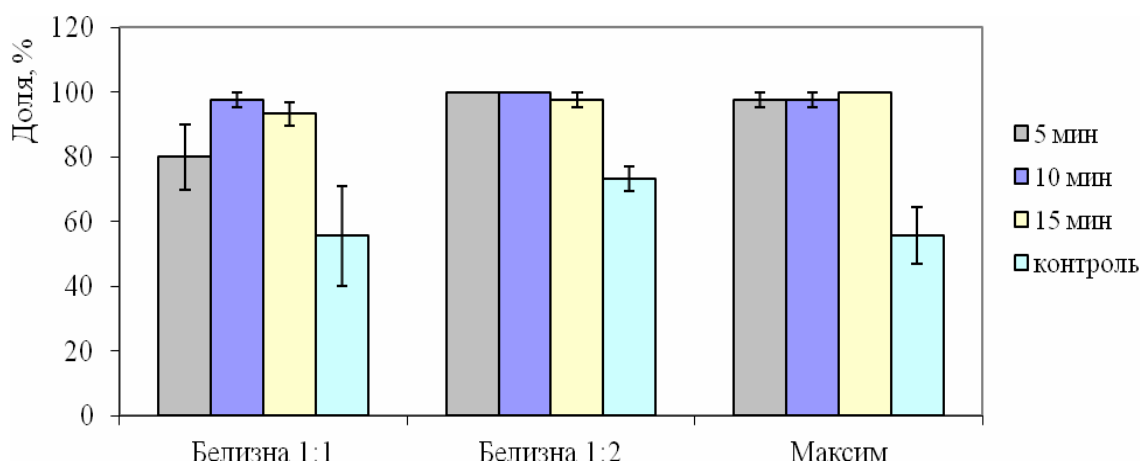


Рисунок 4 – Средние значения доли стерильных проростков кукурузы сорта Радуга в контроле и вариантах предобработки различными стерилизующими растворами

Во всех указанных случаях воздействие стерилизующих агентов было эффективным, т.е. приводило к достоверному повышению доли стерильных проростков через трое суток с момента начала проращивания. При использовании «Белизны» доля стерильных проростков увеличилась на 33-36%, при использовании препарата «Максим» – на 75-79% относительно контроля.

На рисунке 5 приведены средние значения доли проросших зерновок и относительного количества стерильных проростков после предпосевной обработки набухших зерновок МП с индукцией 25 мТл, частотой 3, 6 и 9 Гц в течение 1 и 2 ч воздействия. Проведенная методом дисперсионного анализа статистическая обработка свидетельствует о том, что различия между вариантами опыта и контролем по исследуемым параметрам, недостоверны.

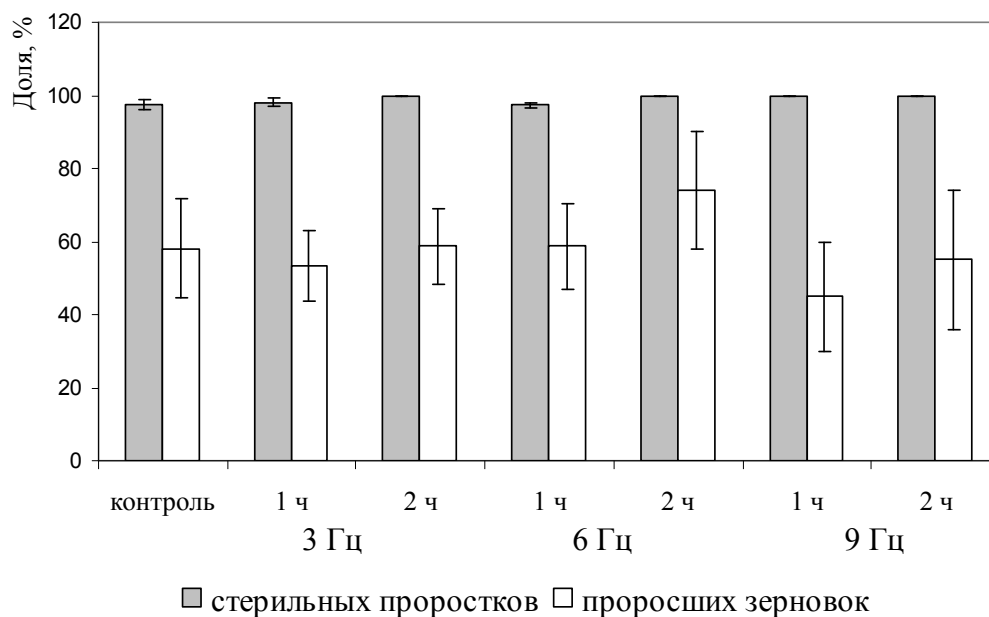


Рисунок 5 – Средние значения доли проросших зерновок и стерильных проростков кукурузы линии АТТМ после предпосевной обработки набухших зерновок низкочастотным МП с индукцией 25 мТл

Следующая серия экспериментов (рисунок 6) была направлена на оценку влияния обработки МП на размеры зародыша.

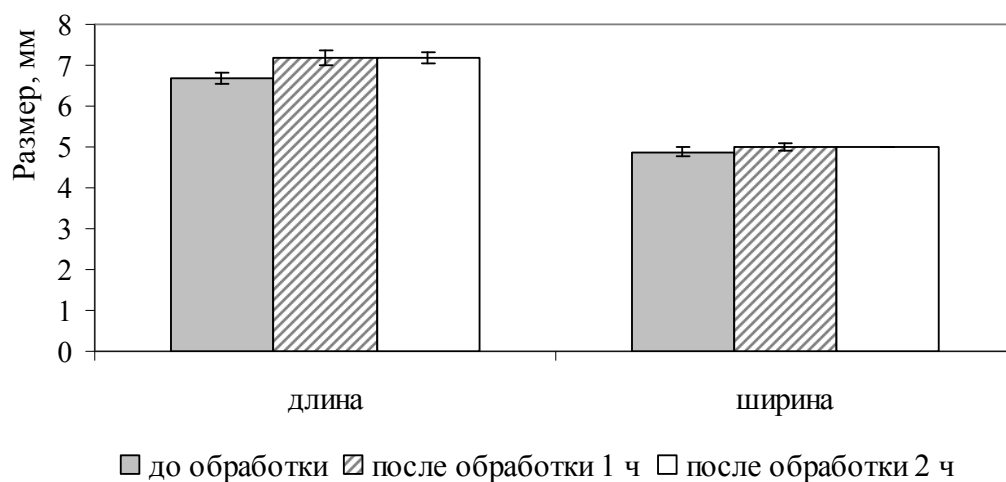


Рисунок 6 – Средние размеры зародыша кукурузы линии АТТМ до и после воздействия МП с частотой 6 Гц и индукцией 25 мТл

В соответствии с результатами дисперсионного анализа, значимыми является эффекты увеличения длины зародышей при воздействии МП в

течение 1 ч ($p < 0,01$; $F = 16,0$) и 2 ч ($p < 0,01$; $F = 20,9$), а также их ширины при варианте отработки 2 ч ($p = 0,04$; $F = 4,3$).

На следующем этапе в стерильных условиях в ламинар-боксе проводилось извлечение зрелых зародышей из зерновок с целью их последующего введения в культуру. При этом следует отметить, что в рассматриваемой серии экспериментов извлечение зародышей из зерновок в случае предобработки МП происходило значительно легче, чем в отсутствие подобной предобработки.

Установлено, что предобработка МП положительно сказывается на инициации роста стерильной культуры зрелых зародышей кукурузы линии АТТМ. При этом сравнение характера развития данного типа эксплантов при их предобработке МП с частотой 6 Гц в течение 1 и 2 ч позволяет сделать вывод о том, что наиболее оптимальным вариантом воздействия является экспозиция в МП 1 ч. В данном варианте предобработки проростки развиты заметно лучше, чем в контроле и варианте экспозиции 2 ч, что хорошо заметно на 14 сутки первичного культивирования эксплантов.

ВЫВОДЫ

1. Стерилизация зерновок кукурузы с помощью коммерческих препаратов «Белизна» («Гринфилд Рус»), «Domestos» («Юнилевер Русь») и «Максим» («Монсанто») эффективна для обеспечения стерильности проростков кукурузы сортов Радуга, Пурпурная Саратовская и линии АТТМ в течение 3-5 суток с момента начала проращивания.

2. Для стерилизации зерновок кукурузы в качестве наиболее доступного и эффективного способа рекомендуется воздействие препаратом «Белизна» в разведении 1:1 или 1:2 в течение 5 минут.

3. Воздействие препаратом «Максим» в течение 5-15 минут способствует повышению количества проросших зерновок (в среднем на 45%) и доли стерильных проростков (на 75-79%) на третьи сутки проращивания.

4. Воздействие МП с частотой 6 Гц и индукцией 25 мТл в течение 1 часа следует рассматривать как оптимальный способ воздействия на набухшие зерновки кукурузы, предназначенные для извлечения зрелых зародышей для последующего их введения в культуру *in vitro*. При данном воздействии зародыши увеличиваются в размерах, легче извлекаются из зерновок и впоследствии более интенсивно иницируются и растут в стерильной культуре.

