

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра генетики

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ ЗРЕЛЫХ
ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ**

Автореферат бакалаврской работы

Студента 4 курса 422 группы

Направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Петрова Всеволода Глебовича

Научный руководитель
зав. кафедрой генетики,
д.б.н., доцент



О.И.Юдакова

Зав. кафедрой генетики,
д.б.н., доцент



О.И.Юдакова

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Электромагнитное излучение (ЭМИ) является физическим фактором среды, который может оказывать на различные живые организмы существенное влияние, причем как негативное, так и положительное. ЭМИ может оказывать на объекты (в том числе и живые) два основных вида воздействия: тепловое (облучение непрерывным радиосигналом) и нетепловое (облучение импульсным радиосигналом). Облучение импульсным радиосигналом не приводит к повышению температуры исследуемого объекта, что в большинстве случаев является позитивным фактором. Однако, в отличие от теплового воздействия ЭМИ, которое достаточно хорошо изучено, исследования воздействия импульсного СВЧ излучения на биологические объекты находится в настоящее время в начальной стадии.

В качестве одного из модельных объектов для изучения влияния ЭМИ на процессы деления растительных клеток может быть использована культура тканей и органов *in vitro*.

Цель проведенного исследования – изучить влияние электромагнитной предобработки зрелых зародышей кукурузы на процесс каллусогенеза в культуре *in vitro*.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) провести электромагнитную предобработку зрелых зародышей кукурузы импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты;
- 2) инициировать каллусогенез в культуре зрелых зародышей кукурузы в контроле (без предобработки) и опыте (с предобработкой зерновок).
- 3) изучить особенности инициации стерильной культуры и развития каллуса в контрольных и опытных вариантах.

Структура ВКР: работа состоит из трех глав, выводов и списка использованных источников. В первой главе приводится обзор литературы по вопросу влияние электромагнитного излучения на растения.

Основное содержание ВКР:

Объектом исследования послужили две линии кукурузы: АТТМ и КМ.

Из обработанных стерилизующими растворами зрелых зерновок кукурузы в стерильных условиях ламинар-бокса выделяли зародыши и помещали их в пробирки на искусственную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС). Закрывали пробирки стерильными пробками и подвергали воздействию переменного электромагнитного поля СВЧ-диапазона с частотой 60 ГГц в течение 5 минут. Эксперимент проводили в нескольких повторностях. В каждой повторности использовали 20 пробирок с облученными зародышами и 20 пробирок с необработанными ЭМИ зародышами, которые служили контролем. В качестве источника ЭМИ использовали генератор сигналов высоких частот Г4-142

Культивирование зрелых зародышей проводили на среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д в климатокамере при температуре 27°C в темноте.

Анализ эксплантов через 4 недели культивирования показал, что у обеих изученных линий как в контрольном варианте (без обработки ЭМИ), так и в опытных вариантах на эксплантах происходило образование каллусной ткани. Однако у линии КМ в контроле частота инициации стерильных культур была существенно ниже по сравнению с линией АТТМ ($33,3 \pm 15,3$ и $60 \pm 27,4\%$, соответственно) (рисунок 1, таблица 1). Причем в разных повторностях эксперимента у обеих линий наблюдалось значительное варьирование этого показателя. Так, у линии КМ частота инициации колебалась от 20,0 до 50,0% (коэффициент вариации $CV=45,8\%$), а у линии АТТМ – от 35,0 до 80,0% (коэффициент вариации $CV=45,6\%$). Это может указывать на зависимость успеха инициации стерильной культуры у данных линий от внешних факторов, которые могли в некоторой степени различаться при введении зародышей в культуру, например, температура в ламинар-боксе, влажность и др.

В экспериментальном варианте (после воздействия на зародыши ЭМИ) у обеих линий успешно инициировались к развитию в среднем около 60% эксплантов (рисунок 1, таблица 1).

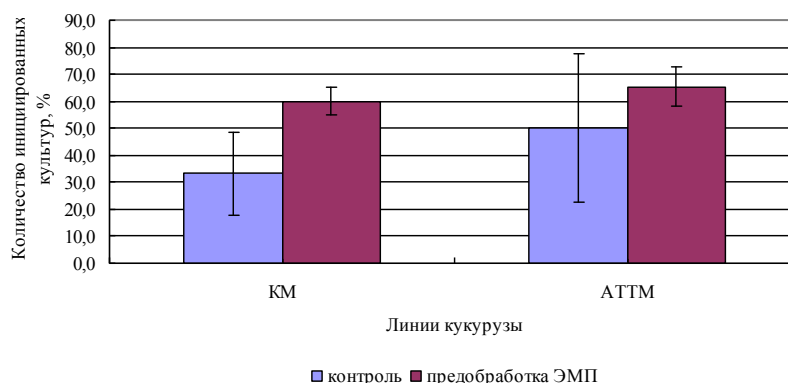


Рисунок 1 – Частота развития каллуса в культуре зародышей кукурузы, не обработанных (контроль) и обработанных импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты (через 4 недели культивирования)

Таблица 1 – Влияние генотипа линии и предобработки зрелых зародышей на инициацию стерильных культур (4 недели культивирования)

Линия (фактор А)	№ повторности	Кол-во инициированных культур, %		Средняя по фактору А
		контроль	после воздействия ЭМИ (фактор В)	
KM	1	20,0	55,0	46,67a
	2	50,0	65,0	
	3	30,0	60,0	
	Среднее значение	33,3±15,3	60,0±5,0	
ATTM	1	35	60	62,50в
	2	80	75	
	3	65	60	
	Среднее значение	60±27,4	65,4±7,1	
Средняя по фактору В		46,67a	62,50в	
F(A) 9,7* F (B) 9,7* F (A×B) 4,56 ns				

Примечание: В каждом варианте изучены три повторности по 20 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются друг от друга по критерию Дункана по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (Duncan's Multiple Range Test); * $p \leq 0,5$.

В повторностях эксперимента частота инициации варьировала в меньшей степени, по сравнению с контролем. Так, у линии КМ количество иницированных культур после воздействия на зародыши ЭМИ составило от 55,0 до 60,0% (коэффициент вариации $CV=8,3\%$), а у линии АТТМ от 65,0 до 70,0% (коэффициент вариации $CV=10,9\%$). Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что на частоту инициации культур оказывает достоверное влияние как генотип линии (при $p \leq 0,5$), так и воздействие на экспланты ЭМИ.

Для того, чтобы определить оказывает ли влияние обработка зародыша импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты на рост каллуса, через 6 недель культивирования экспланты извлекали из пробирок и взвешивали. Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что рост каллуса достоверно зависит от генотипа линии (при $p \leq 0,5$) (таблица 2).

В отличие от линии КМ у линии АТТМ каллусная ткань более активно нарастала как в опытном варианте, так и в контроле. Достоверных отличий по интенсивности развития каллуса в контроле и опыте у линии АТТМ не обнаружено. В контроле средний вес эксплантов составил $41,0 \pm 32,8$ мг, в опытном варианте – $42,0 \pm 13,8$ мг (таблица 2, рисунок 2). У линии КМ, напротив, вес эксплантов после воздействия на зародыши ЭМИ был достоверно больше, чем в контроле ($29,3 \pm 2,4$ и $18,9 \pm 4,5$ мг, соответственно при $p \leq 0,5$).

У кукурузы из тканей щитка зародыша может развиваться два типа морфогенного каллуса: каллус I типа и каллус II типа. Каллус I типа – белый или желтый, плотный, компактный. Он медленно растет, быстро переходит к регенерации и не способен к длительной пролиферации в культуре. Каллус II типа – мягкий, хрупкий, белый или бледно-желтый, часто прозрачный. Он отличается быстрым ростом, при регулярном субкультивировании на свежую питательную среду может поддерживаться в культуре более 2 лет.

Таблица 2 – Влияние предобработки зародыша импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты на рост каллуса (через 6 недель культивирования)

Линия (фактор А)	№ повторности эксперимента	Средний вес каллуса, мг		Средняя по фактору А
		контроль	после воздействия ЭМИ (фактор В)	
КМ	1	15,7	27,6	24,1a
	2	22,0	31,0	
	Среднее значение	18,9±4,5	29,3±2,4	
АТТМ	3	10,0	44,0	41,5в
	4	17,0	23,0	
	6	78,0	56,0	
	7	59,0	45,0	
	Среднее значение	41,0±32,8	42,0±13,8	
Средняя по фактору В		29,95a	35,65a	
F(A) 10,7* F (B) 4,7 ns F (A×B) 4,3 ns				

Примечание: В каждом варианте изучены три повторности по 20 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются друг от друга по критерию Дункана по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (Duncan's Multiple Range Test); * $p \leq 0,5$.

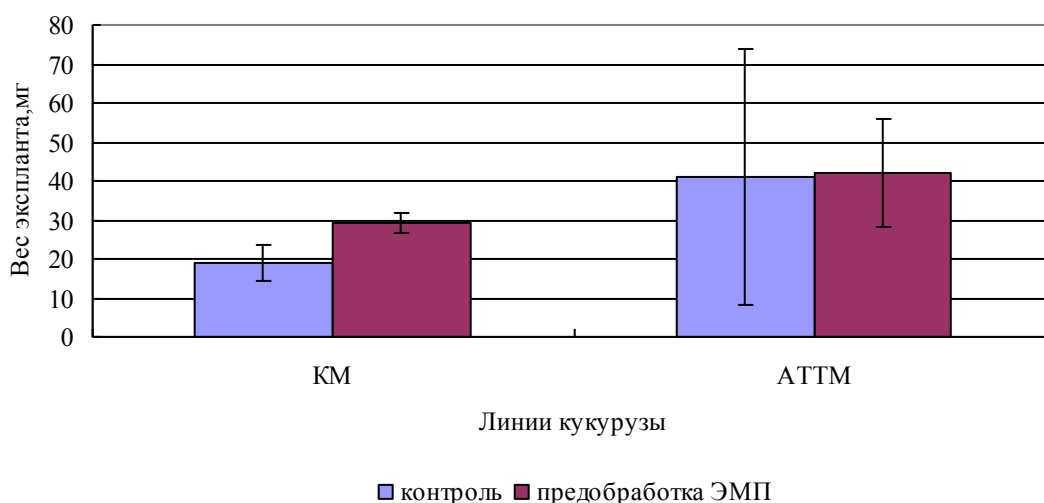


Рисунок 2 – Вес эксплантов в культуре зародышей кукурузы, не обработанных (контроль) и обработанных импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты через 6 недели культивирования)

В проведенном эксперименте у линии КМ из щитка зародыша развивался каллус первого типа, т.е. плотный и компактный (рисунок 3).

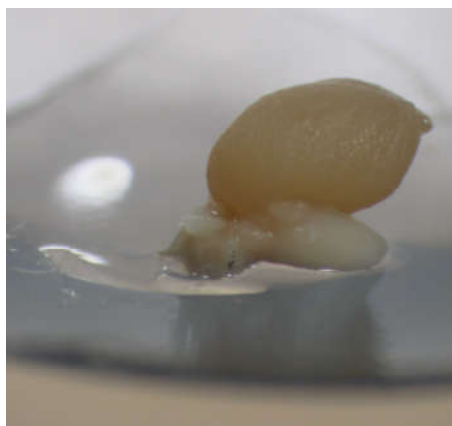


Рисунок 3 – Каллус, развившийся из щитка зародыша линии КМ через 2 месяца культивирования

У линии АТТМ развитие каллуса происходило по второму типу, т.е. формировался мягкий, хрупкий, белый или бледно-желтый каллус, который характеризуется более высокой скоростью роста по сравнению с каллусом первого типа, характерного для линии КМ (рисунок 4). Через 2 месяца культивирования на каллусе формировались глобулярные структуры, которые характерны для эмбрионного каллуса. Из таких структур при переносе каллуса на среды для регенерации развиваются растения-регенеранты посредством непрямого соматического эмбриогенеза или, реже, непрямого органогенеза (рисунок 4, *e*). Способность к развитию того или иного типа каллуса, как правило, определяется генотипом экспланта. Эта закономерность может объяснить, почему в культуре *in vitro* у линии АТТМ происходило более интенсивное развитие каллусной ткани.

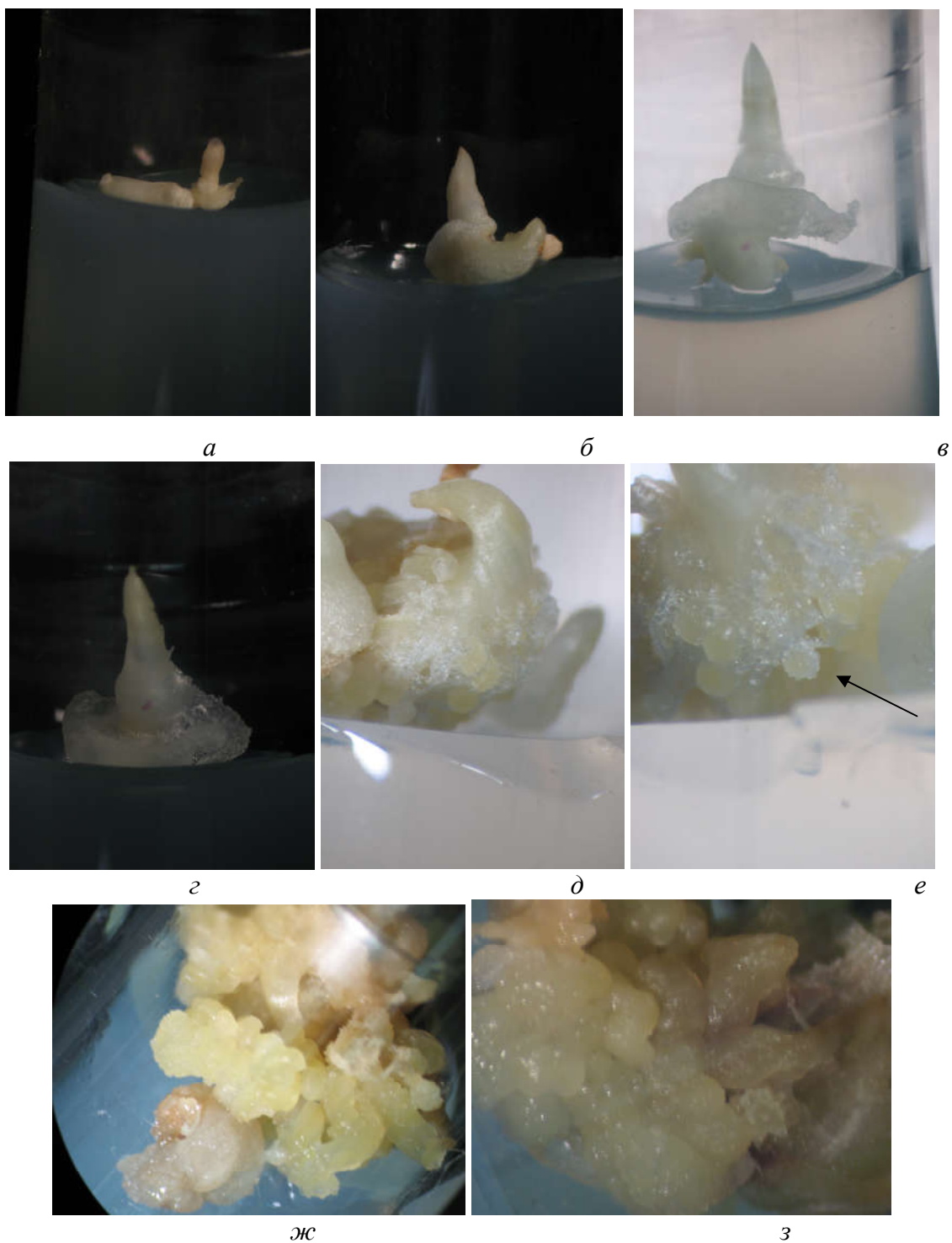


Рисунок 4 – Каллус, развившийся из щитка зародыша линии АТТМ:
а-г – через 1 месяц культивирования; *д, е* – через 2 месяца культивирования; *е*
– развитие на каллусе глобулярных структур (показано стрелкой); *ж, з* –
через 1 месяц субкультивирования на среде МС с 2,0 мг/л 2,4-Д

ВЫВОДЫ

1. При использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей у изученных линий кукурузы (АТТМ и КМ) на частоту инициации каллусной культуры достоверное влияние (при $p \leq 0,5$) оказывал как генотип линии, так и предобработка зародышей импульсным электромагнитным полем сверхвысокой частоты. У линии КМ наблюдалось существенное увеличение (в среднем на 25%) частоты инициации каллусных культур после предобработки эксплантов ЭМИ.

2. После предобработки эксплантов импульсным магнитным полем у линии КМ наблюдалось достоверное увеличение веса каллусов (при $p \leq 0,5$) с $18,9 \pm 4,5$ мг (контроль) до $29,3 \pm 2,4$ мг. Достоверных отличий по интенсивности развития каллуса в контроле и опыте у линии АТТМ не обнаружено ($41,0 \pm 32,8$ и $42,0 \pm 13,8$ мг, соответственно).

3. У линии КМ из щитка зародыша развивался плотный и компактный каллус (каллус первого типа), который характеризуется медленным ростом. У линии АТТМ развитие каллуса происходило по второму типу, т. е. формировался мягкий, хрупкий, белый или бледно-желтый каллус, который характеризуется более высокой скоростью роста по сравнению с каллусом первого типа.

4. Выявленное положительное влияние предобработки эксплантов импульсным магнитным полем на процесс каллусогенеза свидетельствует о перспективности работ по подбору оптимальных параметров ЭМИ для индукции каллусогенеза у линий кукурузы с низким морфогенетическим потенциалом.