

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

Кафедра генетики

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОРФОГЕНЕЗА
В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

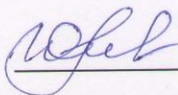
Студента 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

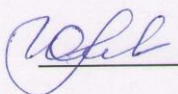
Биологического факультета

Куцева Дениса Сергеевича

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

 29.05.2021 О.И.Юдакова

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

 29.05.2021 О.И.Юдакова

Саратов 2021

Введение. Мировое значение и использование урожая кукурузы увеличили спрос на производство новых высокопродуктивных и экологически пластичных сортов этой культуры. Это в свою очередь делает актуальным использование в селекции новых методов и технологий. Ускорению селекционного процесса способствуют биотехнологические и генноинженерные методы (гаплоидия *in vitro*, генетическая инженерия, клеточная селекция, маркер-ассоциированная селекция, соматическая гибридизация, размножение соматоклональных вариантов и др. У отзывчивых к культуре *in vitro* генотипов кукурузы растения-регенеранты, как правило, получают посредством индукции непрямого соматического эмбриогенеза. Наличие стадии каллусогенеза при данном типе морфогенеза создает риск соматоклональной изменчивости.

Для разработки эффективной технологии клонального микроразмножения кукурузы посредством прямого органогенеза важно точно определять место и время образования на экспланте пазушных побегов. Однако, наличие у листьев кукурузы влагалища, плотно охватывающего стебель, не позволяет сделать это визуально. Изучить динамику и особенности развития пазушных побегов можно только с использованием гистологического анализа эксплантов.

Цель настоящей работы – выявление гистологических особенностей прямого органогенеза в культуре *in vitro* зрелых зародышей кукурузы.

Для достижения данной цели решались следующие задачи:

- 1) подобрать оптимальную экспресс-методику приготовления временных гистологических срезов эксплантов;
- 2) провести темпоральную фиксацию эксплантов через 7, 10, 30 и 60 суток от начала культивирования;
- 3) провести гистологический анализ эксплантов.

Основное содержание работы. В основной части приведён краткий обзор литературы по вопросам культуры клеток и тканей растений *in vitro*.

Рассмотрена важность используемых технологий, описаны пути морфогенеза в культуре *in vitro*, особенности культуры тканей и органов кукурузы.

В разделе материалы и методы описан материал исследования - линия кукурузы АТТМ и используемые методы гистологического анализа.

Результаты исследования. Традиционно гистологический анализ проводят с применением классических методов приготовления микротомных препаратов. Однако эти методы трудоёмки и требуют длительного времени на реализацию. Для анализа большого объёма материала необходимы экспресс-методы. Для чего было принято решение создавать срезы вручную, с помощью сменных лезвий от Т-образного бритвенного станка. К положительным моментам этого метода можно отнести экономию времени и трудозатрат, возможность манипулировать объектом и направлением среза, позволяя затронуть интересующие области в одном срезе. При фиксации же в парафине визуализация объекта затруднена, что мешает выбрать нужную плоскость сечения. Несмотря на то, что препараты, нарезанные вручную имеют различную толщину, возможность в дальнейшем манипулировать объектом (например, раздвинуть препаровальными иглами, раздавить) могут быть даже более предпочтительны по информативности в сравнении со срезами, выполненными на микротоме (Таблица 1).

Минусами метода являются невозможность применить на рыхлых и слишком мягких объектах, невозможно сделать тончайшие срезы. Разная толщина в разных местах среза, возникающая из-за неоднородности объекта ограничивает применение красителей. Требуется опытный исследователь. В сложных объектах тяжело провести точный подсчёт органов, так как после срезания центральных несущих элементов оставшиеся боковые теряют связь между собой и не могут быть выполнены как единый срез. Напротив, препараты, фиксированные в парафине, сохраняют структуру и относительное расположение органов в пространстве.

Таблица 1 – Сравнение методов приготовления срезов эксплантов

Метод приготовления срезов	Преимущества метода
С помощью ротационного микротом	Ровные и тонкие срезы, возможность применять метод на сложных и рыхлых объектах, позволяет получить более детальную информацию.
Вручную	Более быстрый. Меньше трудозатрат. Не требует применения токсичных химреактивов. Возможность манипулировать объектом во время резки.

Окрашивание и просветление тканей

Просветляющая жидкость Герра – агрессивная среда с течением времени разрушает ткани растения и к моменту микроскопии препарат с различными тканями выглядит неоднородно. Клетки проводящих путей сохраняются дольше, а мягкие ткани тяжело визуализируются

Со временем паренхимные ткани просветляются и с увеличением времени обработки вовсе не визуализируются. Это негативный эффект для необходимости визуализации полной анатомии среза, однако у значительно толстых срезах это позволяет избавиться от ухудшенной из-за толщины контрастности и увидеть направление проводящих пучков

Окрашивание гематоксилином отлично сочетается с микротомными срезами, давая ровноокрашенные препараты. Для адаптации окрашивания срезов выполненных вручную лезвием предложена следующая схема:

- Объекты из фиксирующей жидкости промывались 60% спиртом
- Спирт 95° – 20 мин
- Абсолютный спирт – 60 мин
- Смесь спирт-ксилол I – 30 мин
- Ксилол – 2 часа

- Спирт 60% – 10 мин
- Дистиллированная вода – 10 мин (3 раза)
- Производилась резка

В данной работе не проводилась пропитка глицерином, что немного затрудняет нарезание, но экономит время. При необходимости этот этап может быть внесён в методику, однако срезы после этого нужно также двукратно промыть водой. Для ускорения этого этапа, препарат рекомендуется выдержать в 10-15% растворе спирта 5 минут, после этого поместить в глицерин минимум на час.

После этого окрашивание проводилось по описанной методике. Срезы, выполненные в ручную с использованием сменного лезвия зачастую имеют несколько слоёв клеток, и из глубжележащих клеток накопленный краситель вымывается раствором квасцов медленнее, чем из внешних, вследствие чего в некоторых местах образуются тёмные перекрашенные зоны

Окрашивание сафранином не требует подготовки объекта и срезов (промывка ксилолом и протравливание) и выполняется напрямую, без обесцвечивания. После нарезания срезы необходимо отмыть в дистиллированной воде от глицерина и только после окрашивать. Сафранин в отличие от гематоксилина более избирательно окрашивает проводящие пучки, апексы и соцветия, что решает проблему неравномерности ручных срезов

Другие варианты окраски показали худшие результаты или были сложнее в исполнении не неся при этом преимуществ, в связи с чем были исключены из дальнейшей работы (таблица 2)

Таблица 2 – Сравнение эффективности разных вариантов окрашивания

Вариант окраски	Результат
Просветление жидкостью Герра	Просветляет препарат неоднородно, быстро разрушает тонкостенные клетки. Подходит для визуализации пучков толстых срезов.
Гематоксилин	Расположенные в глубине ткани клетки просветляются в квасцах намного дольше клеток внешних слоев. Отлично подходит для микротомных срезов, приемлем для срезов, приготовленных вручную.
Сафранин	Краситель накапливается в клеточных стенках. Лучше задерживается в проводящих пучках и меристематических клетках. Почти не накапливается в цитоплазме клеток. Прост в применении. Среди апробированных методов даёт наилучший результат.
Толуидиновый сини	Лучше окрашивает проводящие пучки. Накапливается во клетках внутренних тканей побега. Сложен в применении
Метиленовый зелёный	Не проявляет избирательности к тканям. Ухудшает визуализацию. Не приемлем.
Хризоидин	Немного выделяет ткани с толстой кутикулой. Мало информативен для целей исследования.

Гистологические особенности прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы. Наличие у листьев кукурузы влагалища, плотно охватывающего стебель, не позволяет визуально наблюдать культивируемых проростков ранние этапы развития пазушных побегов, определять точное время их заложения, степень развития и расположение. Вместе с тем, эти параметры важно учитывать при разработке эффективной

технологии клонального микроразмножения для чего был проведен гистологический анализ.

Введение в культуру *in vitro* зрелых зародышей осуществлялось по отработанной методике: для инициации стерильной культуры использовалась среда Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreac) без гормонов. После того как проростки вырастали до 2–3 см, у них удаляли корень и переносили на среды для микроразмножения.

При разработке методов культивирования растений *in vitro* основным оптимизируемым параметром является содержание фитогормонов в среде, их концентрации и комбинации. Специфические требования к индукторам морфогенеза, условиям культивирования и составу питательных сред во многом определяются генотипом растений.

Для индукции прямого органогенеза необходимо было добиться развития пазушных вегетативных побегов. Для этого необходимо снять апикальное доминирование и исключить образование у проростков корней, которые препятствуют мультипликации побегов.

Для индукции прямого органогенеза чаще всего используют БАП в концентрации от 0,5 до 10 мг/л. Он индуцирует не только формирование первичного побега из различного типа эксплантов, но и образование пазушных побегов. Присутствие в среде MS кинетина замедляет рост побегов стимулирует образование придаточных корней и уменьшает развитию пазушных побегов.

Сочетание этих гормонов снимало апикальное доминирование у экспланта, приводило к развитию пазушных побегов и исключало ризогенез. Через 2 мес культивирования длина побега в среднем составляла 8,6 мм. В его базальной части, как правило, в зоне узла, ближайшего к месту среза, развивались 1-2 коротких пазушных побега. Однако у проростков

наблюдались морфозы: искривление побегов, расширение и деформация листовых пластинок.

На среде с добавлением БАП с ИУК у проростков практически отсутствовали морфозы, которые были характерны для эксплантов, развившихся на средах с БАП и кинетином, но пазушные побеги были единичными

Образования максимального количества пазушных побегов удалось добиться лишь на среде, в которой в качестве индуктора морфогенеза присутствовал только БАП в концентрации 2,0 мг/л. Несмотря на то, что на среде с 2,0 мг/л БАП развивалось максимальное количество пазушных побегов, для длительного культивирования она оказалась непригодной. Если время культивирования на ней превышало три месяца, эксплант превращался в пучок многочисленных укороченных микропобегов, которые было сложно отделить друг от друга и которые затем плохо приживались при переносе на новую среду того же состава. Кроме того, у некоторых эксплантов вместо вегетативных почек закладывались генеративные почки (рисунок 1).

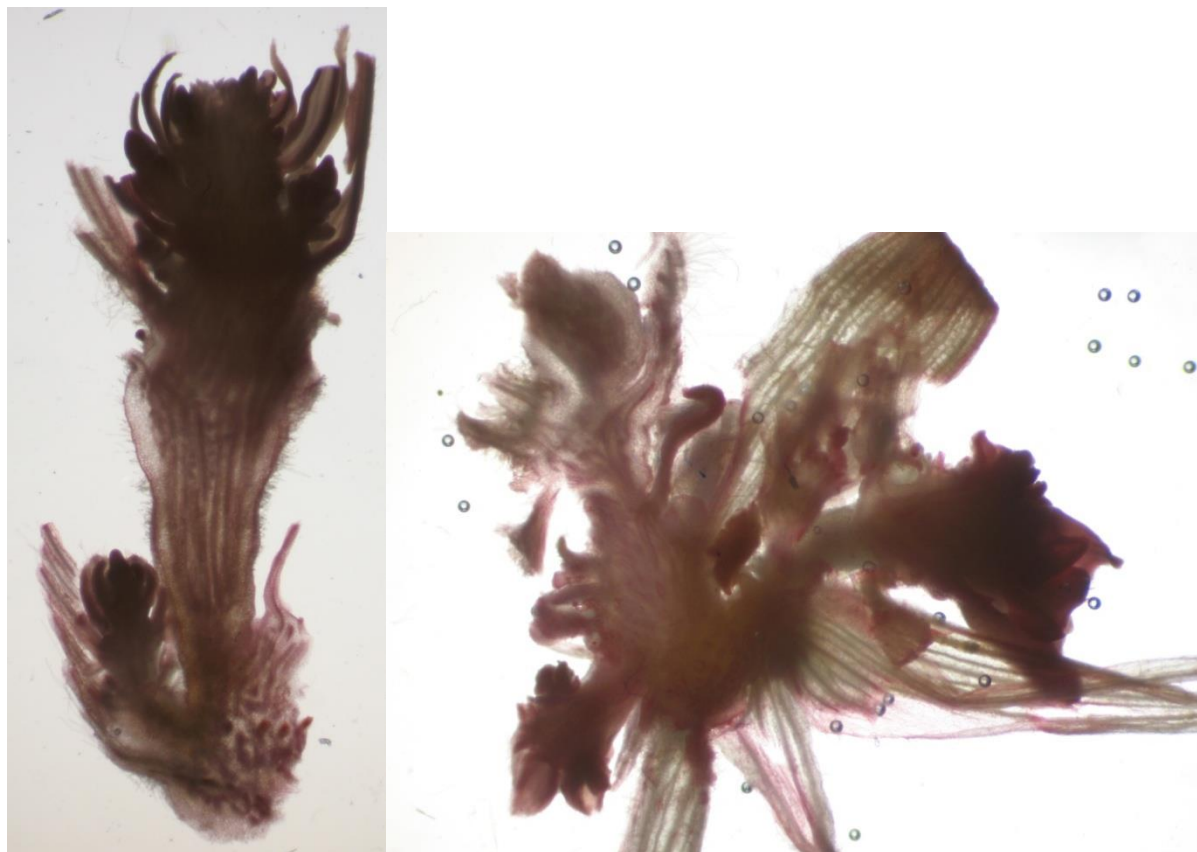
У всех исследованных эксплантов каллус в зоне среза отсутствовал. Через 7 суток от начала культивирования на среде с 2,0 мг/л БАП в районе калеоптилярного узла начинали формироваться пазушные почки.. В условиях *in vivo* расположение пазушных почек повторяет расположение листьев на стебле. У кукурузы листья отходят по одному от каждого узла, поочередно с одной и с другой стороны стебля. Однако в условиях *in vitro* пазушные почки имели мутовчатое расположение. Они располагались радиально, на одинаковом расстоянии друг от друга. Пазушные почки характеризовались строением, типичным для вегетативных почек. Они представляли собой конус нарастания (апикальную меристему), окруженный листовыми примордиями.

При концентрации БАП 0,5 мг/л развитие эксплантов происходило практически идентично, но с опозданием в среднем на 10-20 суток



Рисунок 1 – Экспланты, культивируемые на среде MS с добавлением 2,0 мг/л БАП: *а* – через 5 дней культивирования (препарат просветлён в жидкости Гера); *б* – через 10 сут культивирования (препарат окрашен гематоксилином); *в* – через 60 сут культивирования (окрашен сафранином); *г-е* - через 3 месяца культивирования

Концентрация БАП 4.0 мг/л способствовала заложению множественных вегетативных почек на экспланте, но развивающиеся побеги были сильно укороченными, что, затрудняло дальнейшую работу с ними (рисунок 2).



а

б

Рисунок 2— Экспланты, культивируемые на среде MS с добавлением 4,0 мг/л БАП (продольные срезы, окрашенные сафранином): *а* – через 19 недель культивирования (значительная часть пазушных побегов не вошла в данный срез); *б* – через 17 недель культивирования

Данные, полученные в ходе гистологического анализа, позволили определить наиболее оптимальные сроки субкультивирования эксплантов в зависимости от того, какая задача будет решаться на следующем этапе микроразмножения: укоренение побегов или поддержание культуры побегов. При индукции ризогенеза не желательно, чтобы на экспланте присутствовали пазушные побеги второго и третьего порядка, так как это может привести к

развитию регенеранта с нетипичной морфологией (ветвящимся побегом). В связи с этим, разделение пазушных побегов для укоренения побегов следует проводить не позднее 40 сут культивирования на среде с 0,5 мг/л БАП и 30 сут на среде с 2,0 мг/л БАП.

Если же разделённые пазушные побеги предполагается пассивировать на новые среды для дальнейшего микроразмножения, наличие у них почек и пазушных побегов второго и третьего порядка будет способствовать мультипликации побегов. В этом случае разделение эксплантов, развившихся на среде с 0,5 мг/л БАП, следует проводить не ранее 60 сут культивирования, а развившихся на среде с 2,0 мг/л БАП – не ранее 45 сут.

ВЫВОДЫ

1. Для гистологического анализа эксплантов кукурузы наиболее эффективным экспресс-методом приготовления препаратов из 9 апробированных вариантов оказалась методика приготовления срезов с использованием сменных лезвий и последующим окрашиванием 1% водным раствором сафранина.

2. Результаты гистологического анализа эксплантов показали, что на среде MS с добавлением 2,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л кинетина через 20 сут культивирования в зоне узлов закладываются вегетативные почки, прорастающие затем в пазушные побеги. У проростков наблюдались морфозы: искривление побегов, расширение и деформация листовых пластинок.

3. При культивировании эксплантов на среде MS с добавлением 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК у них отсутствовали морфозы, но пазушные почки были единичными.

4. Наибольшее количество пазушных побегов развивалось у эксплантов, культивируемых на среде MS с добавлением БАП в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л БАП. Гистологический анализ показал, что экзогенный БАП инициирует деление клеток интеркалярных меристем экспланта и изменяет направление их дифференциации. Сначала в колептилярном узле, а затем и в основании выше расположенных фитомеров развиваются пазушные вегетативные побеги. На среде MS с 2,0 мг/л БАП, по сравнению со средой с 0,5 мг/л БАП, развитие пазушных побегов первого, второго и третьего порядка происходит раньше на 10-20 сут.

5. При культивировании эксплантов на среде MS с 4,0 мг/л БАП на эксплантах закладывались множественные вегетативные почки, но развивающиеся побеги были сильно укороченными, что затрудняло дальнейшую работу с ними