

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра генетики

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА У
ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ
IN VITRO

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Макухиной Татьяны Олеговны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

14.06.24  Т.А. Алаторцева

Научный консультант:

ведущий биолог учебно-научной лаборатории

биотехнологии

и репродуктивной биологии

14.06.24  Н.В. Апанасова

Зав. кафедрой:

д - р. биол. наук

14.06.24  О.И. Юдакова

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень сельского хозяйства требует от селекционеров создания новых качественных сортов растений. Для этого требуется привлечение современных технологий. Широкий перспективы открывает метод *in vitro*, ускоряющий традиционный селекционный процесс.

Использование данного метода предполагает получение каллусных штаммов с высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом, которые востребованы и для генно-инженерных работ. К сожалению, многие практически ценные линии и гибриды кукурузы не всегда удаётся воспроизвести в стерильной культуре. Поэтому важен поиск форм, перспективных для культивирования *in vitro*.

Таким качеством могут обладать линии кукурузы с элементами партеногенеза, имеющие тенденцию к образованию гаплоидов. В связи с этим, исследования по введению их в культуру *in vitro*, являются актуальными и практически значимыми.

Цель настоящей работы:

Оценить перспективы введения в культуру *in vitro* зрелых зародышей трёх форм кукурузы, производных партеногенетической линии.

В задачи эксперимента входило:

1. Подобрать эффективное средство для стерилизации посадочного материала.
2. Изучить направленность морфогенетических процессов в культуре изолированных зародышей трёх линий кукурузы.
3. Исследовать зависимость частоты каллусогенеза от состава питательной среды донорных форм.
4. Оценить влияние генотипа донора на частоту образования каллуса.

Краткая характеристика материалов:

Объектом работы являлись 3 линии кукурузы, производные партеногенетической линии АТ1:

1. АТТМ (bm2, y1, g1).
2. АТТМ (bm2, lg2, y1, wx).
3. АТТМ (bm2, y1, wx).

Это линии, входящие в серию линий АТТМ (получена путем скрещивания линии ТМ и линии АТ1 (пыльцевой родитель). Линия ТМ маркирована по всем 10 хромосомам рецессивными генами:

bm_2 – brown midrib (коричневая средняя жилка листа) – ген расположен в первой хромосоме, его действие проявляется на взрослых растениях.

Lg_1 – liguleless leaf (безлигульный лист) – локализован во второй хромосоме, его действие проявляется на взрослых растениях.

A_1 – anthocyaninless (отсутствие антоциановой окраски) – расположен в третьей хромосоме. Растение без антоциана, бесцветный алейрон, с зеленой или коричневой окраской. $A1/a1$ – отсутствие антоциана.

Su_1 – sugary endosperm (сахарный эндосперм) – расположен в четвертой хромосоме. Определяется на сухих зерновках, имеющих морщинистый, стекловидный эндосперм.

$Pr1$ – red allelone (красный алейрон) – расположен в пятой хромосоме. При скрещивании с формами с антоциановой окраской, изменяет пурпурную окраску алейрона на красную.

Y_1 – yellow endosperm (желтый эндосперм) – расположен в шестой хромосоме, хорошо определяется на зерновках.

Gl_1 – glossy seedling (глянцевые всходы) – расположен в седьмой хромосоме, действие определяется на стадии проростков или ранних всходов.

J_1 – japonica (белая полосатость листьев) – расположен в восьмой хромосоме, наличие его определяется на взрослых растениях, проявляется характерная полосатость на листьях или на пасынковых растениях, обусловленная хлорофилльной мутацией.

Wx – waxu endosperms (восковидный эндосперм) – расположен в девятой хромосоме, определяется на сухих зерновках, они приобретают матовый цвет. При обработке йодом окрашиваются в красный цвет.

G₁ – golden (золотистая окраска листьев и стеблей) – расположен в десятой хромосоме, определяется на взрослых растениях.

Структура и объём работы.

Работа изложена на 45 страницах машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с 1 таблицей, 17 рисунками и выводы. Список использованных источников насчитывает 27 наименования.

Обзор литературы.

В данной главе представлены литературные данные о методике и возможностях метода *in vitro*, о путях регенерации растений в стерильной культуре и факторах, влияющих на этот процесс.

Материалы и методы.

В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши, полученные из простерилизованных сухих зерновок. Для оценки качества стерилизации были апробированы разные варианты дезинфицирующих растворов.

В первом случае на зерновках удаляли семенную кожуру в области зародыша и после ополаскивания 70% этиловым спиртом семена выдерживали в 0,5% водном растворе натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты (мертиолят) в течение 5 минут. Затем проводилась их трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой.

Во втором случае вместо раствора натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты (мертиолят) использовали коммерческое средство «Белизна» (действующее вещество – гипохлорид натрия) в разведении 1:6. (20 минут).

В ламинар-боксе из обработанных зерновок вычленили зародыши и помещали на питательную среду щитком вниз. Для культивирования использовали 4 варианта питательной среды (MS) с разным количеством 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д): 1) безгормональный вариант; 2) 2,4

–Д – 2,0 мг./л; 3) 2,4-Д - 3,0 мг./л; 4) 2,4-Д – 4,0 мг./л. Все варианты среды содержали сахарозу в количестве 20 г/л, были дополнены витаминами и агар-агаром (7,5 г/л). рН сред доводили раствором NaOH до величины 5,8 – 6,1 (перед автоклавированием).

Культивирование проводили в темноте в климатокамере «Sanyo MLR–352» при температуре $25 \pm 2^{\circ}$ С. Анализ эксплантов осуществляли с использованием микроскопа МБС-9. Объекты фотографировали с помощью фотокамеры Canon PC 1200 с применением компьютерного программного обеспечения Canon Utilities ZoomBrowser EX 5.7.

Достоверность статистических данных по результатам оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей

Результаты исследования

1 Подбор дезинфицирующих средств

Для стерилизации семян кукурузы нами были испытаны два варианта обработки, различающиеся использованием, в комплексе с другими идентичными средствами, 0.5 % водного раствора натриевой соли этилмеркуртиосалициловой кислоты (мертиолят) и водного раствора коммерческого средства «Белизна» содержащего гипохлорит натрия (в разведении 1:6).

Установлено, что эти растворы обладают разной дезинфицирующей силой и по-разному влияют на жизнеспособность зародышей. Наибольшее количество выживших зародышей было отмечено после обработки семян раствором средства «Белизна». После использования мертиолята количество неинфицированных эксплантов было иногда выше, чем после обработки растворами, включающими «Белизну», но при этом большинство зародышей оставалось в неизменном состоянии и приблизительно через две недели они некротизировали. Поэтому в своём эксперименте в качестве дезинфицирующего раствора в дальнейшем использовали только раствор средств «Белизна».

Так после обработки зерновок линии АТТМ (bm2, y1, g1) средствами, в комплексе мертиолятом, жизнеспособными оказались 3,7% зародышей на безгормональной среде №1 и 6,7% на среде № 4 (2,4-Д – 4,0 мг/л). При использовании средства «Белизна» количество выживших эксплантов было значительно выше и составляло в зависимости от состава среды от 70,0 % (среда № 2) до 82,8% на безгормональной среде № 1. В случае применения мертиолята для семян кукурузы линии АТТМ (bm2, lg2, y1, wx), жизнеспособными оказались, только 3,4 % эксплантов на безгормональной среде №1 и 3,3% – на среде №3 (2,4 -Д – 3,0 мг/л). После применения «Белизны» морфогенетическая проявилась на всех исследуемых средах с максимумом 88,0 % на среде № 2 (2,4 -Д – 2,0 мг/л).

Для зародышей линии АТТМ (bm2, y1, wx), как и для двух других донорных линий, было отмечена очень низкая жизнеспособность эксплантов после использования мертиолята: 3,3% на среде №2 и 6,0% на безгормональной среде №1. В то время как зародыши, зерновки которых прошли обработку раствором «Белизны», почти не потеряли морфогенетическую активность на всех четырёх испытанных вариантах среды.

2 Направления морфогенетических реакций

Развитие зародышей, успешно прошедших процесс стерилизации и адаптировавшихся к условиям экзогенного питания, могло происходить двух направлениях. В зависимости от состава среды они могли прорасти двумя путями. Развитие происходило без образования корня, если среда включала 2,4-Д в разных концентрациях: 2,0 мг/л (среда №2), 3,0 мг/л (среда № 3) и 4,0 мг/л (среда №4). В отсутствие гормонов (среда №1), отмечалось нормальное формирование растений.

На средах, содержащих 2,4 –Д происходило ингибирование процесса корнеобразования и индукция каллусогенеза. Каллус появлялся в области щитка зародыша, если колеоптиль еще не развился

На обеих поверхностях был отмечен каллус двух типов: ризогенный и глобулярный. Каллус ризогенного типа, формировал только корни, покрытые корневыми волосками. Пересадка на свежие среды не приводила к смене морфогенетической реакции, и вновь имел место только ризогенез. Такой тип каллуса оказался неперспективным для получения растений-регенерантов. Кроме ризогенного и глобулярного каллусов, имел место и не перспективный для получения каллусных штаммов, способных регенерации растений, названный нами как «влажный», или «мокрый» каллус. Такой каллус, не воспроизводился при последующих пассажах и некротизировал.

3 Влияние генотипа и состава среды на индукцию каллусогенеза

Сравнение результатов культивирования зародышей трёх названных линий на четырёх вариантах питательной среды показало, что имеет место варьирование частоты индукции каллусогенеза от щитка и колеоптиля в зависимости от генотипа (донорной линии) и состава питательной среды.

Установлено, что при культивировании зародышей линии АТТМ (bm2, y1, g1) на безгормональной среде №1 каллус не образуется. При этом, частота каллусогенеза от колеоптиля варьирует, от минимального значения 12,0 % на среде №4 (2,4-Д – 4,0 мг/л) до максимального – 37,0 % на среде №2 (2,4-Д – 2,0 мг/л). Каллус от щитка обнаружен на средах №2, №3, №4. Максимальная частота его формирования – 66,7 % отмечена на среде №2, а минимальная – 16,0 % на среде №4.

В культуре зародышей линии АТТМ (bm2, y1, wx), каллус на поверхности колеоптиля возникал приблизительно с одинаковой частотой на всех средах с 2,4-Д, около 14 %.

В культуре зародышей кукурузы линии АТТМ (bm2, lg2, y1, wx) каллус от колеоптиля формировался с достаточно высокой частотой на всех гормональных средах, с достоверным максимумом – 92,9% на среде №2 (2,4-

Д –2,0 мг/л). На этом же варианте среды формировался каллус от щитка у большинства эксплантов этой линии (57,1 %).

Учитывая степень варьирования частоты каллусогенеза в зависимости от состава питательной среды (в представленных выше результатах), было принято далее решение использовать в эксперименте только два варианта питательной среды с количеством 2,4-Д: 2 мг/л (среда №2) и 3 мг/л (среда №3).

Установлено, что при культивировании зародышей кукурузы линии АТТМ (bm2, y1, g1), варьирование частот проявления ризогенного и глобулярного каллусы, имеющих место на обоих вариантах питательных сред незначительно.

Что касается зародышей кукурузы линии АТТМ (bm2, y1, wx), то и здесь на среде № 2 (2,4-Д – 2,0 мг/л), достоверно ниже частота образования ризогенного каллуса (49,2 %) по сравнению со средой № 3 (2,4-Д – 3,0 мг/л), где ризогенный каллус встречается у 66,7 % эксплантированных зародышей.

Анализ результатов культивирования зародышей кукурузы линии АТТМ (bm2, lg2, y1, wx), показал, что на обеих средах преимущество в проявлении имеет ризогенный каллус. Он отмечен у всех (100%) эксплантированных зародышей. Глобулярный морфогенный каллус имел место у 12,5 % зародышей на среде № 2 (2,4-Д – 3,0 мг/л) и 20,0 % эксплантов на среде № 2 (2,4-Д – 2,0 мг/л), что не является достоверным различием.

Таким образом, можно отметить, что зародыши всех трёх линий способны формировать ризогенный и глобулярный каллусы как от поверхности щитка, так и от колеоптиля. Проявление этой морфогенетической реакции зависит как от генотипа донора, так и от количества ауксина в питательной среде. Исходя полученных данных, более универсальной средой для получения морфогенных каллусных штаммов от

изолированных зародышей кукурузы линий с элементами партеногенеза является среда № 2, содержащая 2,4-Д в количестве 2,0 мг/л.

Маркуц