

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

Кафедра генетики

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*  
ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ**

Автореферат бакалаврской работы  
Студента 4 курса 422 группы  
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Павлова Никиты Алексеевича

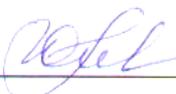
Научный руководитель:

доктор биол. наук, доцент

14.06.24  О.И. Юдакова

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, доцент

14.06.24  О.И. Юдакова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Гаплоидами называют организмы с одинарным набором хромосом. В селекционно-генетической практике удвоение их числа у гаплоидных растений – эффективный метод получения гомозиготных линий, которые обладают необходимыми человеку свойствами и признаками, что ускоряет селекционный процесс в несколько раз. Гомозиготные линии часто рассматриваются как первый шаг в генетическом улучшении овощных культур.

Одной из важных сельскохозяйственных культур является кукуруза (*Zea mays* L.), в связи с чем актуальным является создание новых высокопродуктивных сортов и линий. Кукуруза хорошо исследована с точки зрения физиологии и генетики, что делает ее также одним из основных модельных объектов для данных научных направлений. Решение практических и теоретических задач часто строится на использовании в качестве исходного материала гаплоидных растений кукурузы. Однако частота их спонтанного образования крайне мала и варьирует в пределах 0,001-0,1% (1:1000 растение).

Увеличить количество гаплоидов можно было бы посредством их размножения, но гаплоидные растения кукурузы характеризуются практически 100% стерильностью и отсутствием способности к вегетативному размножению. Как правило, проблемы с искусственным размножением в подобных случаях помогают решать технологии клонального размножения растений. Однако до настоящего времени не разработано протоколов клонального микроразмножения гаплоидов кукурузы.

Целью настоящей работы была оценка перспективности введения в культуру *in vitro* гаплоидных растений линий кукурузы с наследуемым партеногенезом.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) среди выращиваемых в полевых условиях растений кукурузы отобрать гаплоидные растения для дальнейшего их использования в качестве доноров эксплантов;

- 2) подобрать оптимальный метод стерилизации первичных эксплантов;
- 3) определить эффективность различных типов первичных эксплантов для введения в стерильную культуру;
- 4) определить наиболее оптимальный состав питательной среды и индукторов морфогенеза для инициации морфогенеза;
- 5) провести гистологический анализ развивающихся в культуре *in vitro* эксплантов гаплоидных растений кукурузы.

**Структура и объём работы.** Выпускная квалификационная работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка использованных источников и содержит 16 рисунков и 3 таблицы. Общий объем работы составляет 48 страниц. Количество использованных литературных источников составило 69 шт., из них 29 на иностранном языке.

**Научная новизна и значимость работы.** Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования фрагментов стержня незрелого початка для введения в культуру *in vitro* гаплоидных растений кукурузы с наследуемым типом партеногенеза.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1 Гаплоидия.**

В главе представлен обзор литературных данных о гаплоидии, её классификации, механизмах возникновения как спонтанной гаплоидии, так и индуцированной; явлениях, при которых возникают гаплоиды и их классификация, а также о практическом применении гаплоидов в селекционном процессе; о линиях-гаплоиндукторах кукурузы и линиях с наследуемым типом партеногенеза, разработанных на базе кафедры генетики Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

### **2 Кукуруза в культуре *in vitro*.**

В главе представлен обзор литературных данных о культуре растений *in vitro* и наиболее эффективных методах введения кукурузы в культуру тканей, их плюсах и минусах.

### **3 Материал и методы исследования.**

Материалом исследования являлись гаплоидные растения партеногенетической линии кукурузы АТТМ, маркированные рецессивными генами. Растения выращивали в открытом грунте на экспериментальных полях ФГБНУ РосНИИСК «Россорго». На репродуктивной стадии развития был проведен отбор гаплоидных растений по морфологическим признакам и низкому росту.

В исследовании использовали классические методы культивирования *in vitro*. Для введения в стерильную культуру срезанные в полевых условиях початки очищали от обертки. Нарезали на несколько сегментов, помещали в стакан и заливали 70% спиртом на 30 с. Поверхностную стерилизацию проводили 0,5%-ым раствором мертиолята натрия в экспозиции 3, 5, 8 и 12 минут.

В качестве первичных эксплантов были сравнительно изучены:

- 1) одиночные пестичные цветки;

- 2) пестичные цветки с прилегающим участком стержня початка;
- 3) конгломерат из нескольких пестичных цветков

Для первичного культивирования использовали питательные среды: по Мурасиге-Скугу (MS) и N6. В качестве индукторов морфогенеза применяли цитокинин БАП и ауксины: НУК и 2,4-Д в различных концентрациях и соотношениях.

Для проведения гистологического анализа экспланты извлекали из питательной среды и помещали в фиксатор Кларка (ацеталкоголь, 3:1). Из зафиксированного материала были приготовлены постоянные парафиновые и просветленные препараты.

**4 Результаты и их обсуждения. 4.1 Инициация стерильной культуры с использованием в качестве доноров эксплантов гаплоидных растений кукурузы.** Всего было введено в культуру *in vitro* 1780 эксплантов. Стерилизация эксплантов мертиолятом в течение 5 минут оказалась неэффективной, количество стерильных эксплантов на 7 сут от начала культивирования составило 49,83%. Процент стерильности эксплантов возрастал до 99,9 и 100% при увеличении экспозиции до 8 и 12 минут, соответственно (рис. 1) (табл. 1). Однако обработка эксплантов мертиолятом в течении 12 минут оказывало токсичное влияние на растительный материал, вследствие чего в дальнейшем экспланты не развивались и быстро дегенерировали. Исходя из полученных результатов, в дальнейшем экспланты стерилизовали мертиолятом в течении 8 минут.

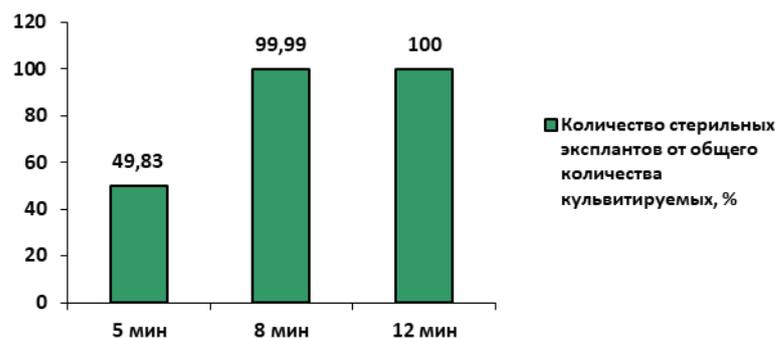
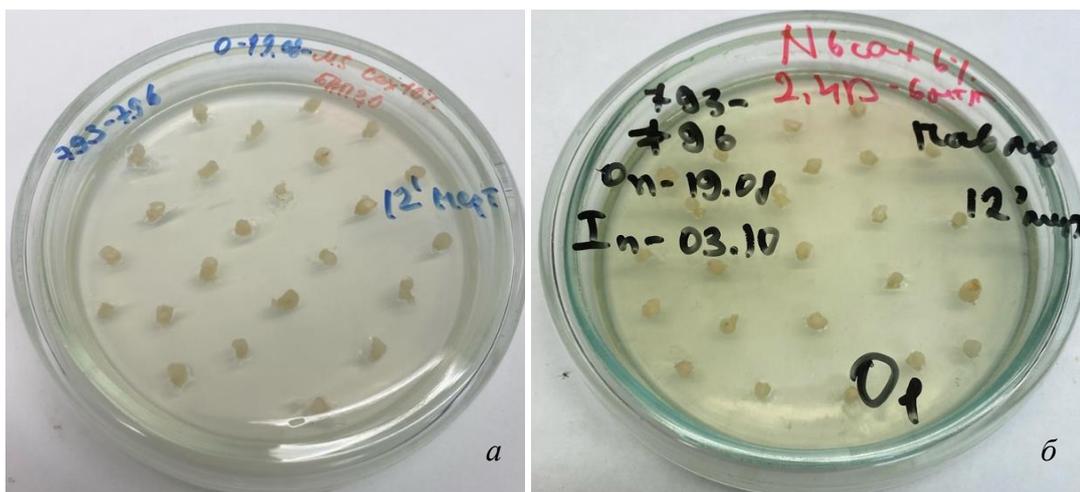


Рисунок 1 – Стерильность первичных эксплантов на 7 сут культивирования после обработки мертиолятом

Таблица 1 – Эффективность стерилизации эксплантов при разной длительности обработки

Длительность стерилизации, мин	Количество эксплантов		Стерильность эксплантов, %
	всего, шт.	стерильных, шт.	
5	839	418	49,83
8	869	864	99,99
12	72	72	100

Сравнительный анализ приживаемости в культуре *in vitro* разных типов первичных эксплантов показал неэффективность культивирования пестичных цветков и конгломерата, состоящего из нескольких цветков. Одиночные цветки на всех использованных средах продолжительное время (до 2 месяцев и более) оставались жизнеспособными и не имели признаков дегенерации, но их развития не происходило (рис. 2). Конгломераты из нескольких цветков постепенно желтели и также не развивались (рис. 3).



а – нулевой пассаж; б – через 2 месяца культивирования

Рисунок 2 – Одиночные пестичные цветки кукурузы в культуре *in vitro*



Рисунок 3 – Пожелтевшие неразвившиеся конгломераты цветков кукурузы через 2 месяца от начала культивирования

Результативным оказался вариант с использованием в качестве первичного экспланта одиночных цветков с участком стержня початка. При культивировании на средах с добавлением БАП у части эксплантов происходило образование зеленых глобулярных структур на месте прикрепления цветка к стержню початка (рис. 4), что может свидетельствовать о начале прямого геммогенеза. При культивировании на средах с добавлением 2,4-Д на месте прикрепления цветка к стержню початка наблюдалось формирование вид бесцветного «сахаристого» каллуса (рис. 5). При этом

цветок мог как дегенерировать (рис. 5 а), так и не иметь признаков дегенерации (рис. 5 б).



Рисунок 4 – Образование зеленых глобулярных структур (выделено красным) на месте прикрепления цветка к стержню початка при культивировании на средах с добавлением БАП

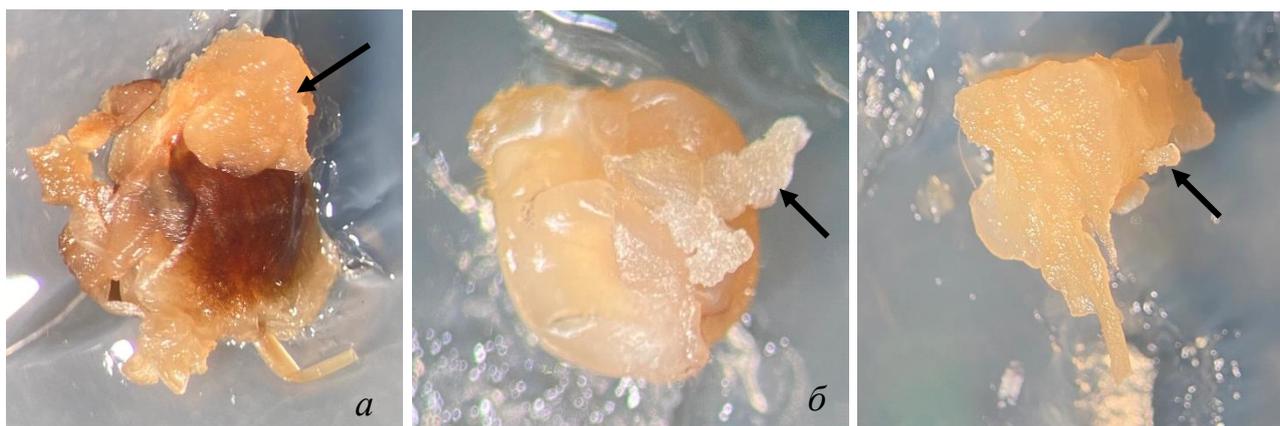


Рисунок 5 – Образование «сахаристого» каллуса (показано стрелкой) на месте прикрепления цветка к стержню початка при культивировании на средах с добавлением 2,4-Д

Для индукции морфогенеза было апробировано 14 вариантов сред с разным минеральным составом, содержанием углеводов и фитогормонов. На среде №6 развитие эксплантов не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты культивирования первичных эксплантов на средах N6 и MS с разным содержанием фитогормонов и сахарозы через 1 месяц культивирования

Содержание сахарозы и фитогормонов в среде	Количество эксплантов, инициированных к развитию				
	всего, шт.	посредством прямого геммогенеза		посредством каллусогенеза	
		шт.	%	шт.	%
Среда N6					
Сахароза 6% БАП 6,0 мг/л НУК 2,0 мг/л	25	0	0	0	0
Сахароза 6% БАП 2,0 мг/л	83	0	0	0	0
Среда MS					
Сахароза 5% БАП 2,0 мг/л	114	0	0	0	0
Сахароза 5% БАП 1,0 мг/л	85	0	0	0	0
Сахароза 6% БАП 6,0 мг/л	44	0	0	0	0
Сахароза 6% БАП 2,0 мг/л	74	0	0	0	0
Сахароза 6% БАП 6,0 мг/л НУК 2,0 мг/л	25	0	0	0	0
Сахароза 10%, БАП 2,0 мг/л	375	<b>13</b>	<b>3,5</b>	0	0
Сахароза 8% 2,40Д 4,0 мг/л	25	0	0	0	0
Сахароза 10% 2,4-Д 2,0 мг/л	325	0	0	0	0
Сахароза 10% 2,4-Д 4,0 мг/л	287	0	0	<b>6</b>	<b>2,5</b>
Сахароза 10% 2,4-Д 4,0 мг/л AgNO3 10 мг/л	163	0	0	0	0
Сахароза 10% 2,4-Д 6,0 мг/л	130	0	0	<b>20</b>	<b>15,4</b>
Сахароза 10% 2,4-Д 2,0 мг/л БАП 0,2 мг/л AgNO3 10 мг/л	25	0	0	0	0

На среде MS при низких концентрация сахарозы и независимо от содержания фитогормов также не зарегистрировано развития эксплантов. Через 1 месяц культивирования начало морфогенеза наблюдали только на средах с высокой концентрацией в них сахарозы (100 г/л). На таких средах при добавлении в качестве индуктора морфогенеза БАП в концентрации 2,0 мг/л у

3,46% эксплантов зарегистрирована индукция прямого геммогенеза, а при добавлении 2,4-Д в концентрациях 4,0 и 6,0 мг/л – начало каллусогенеза у 2,5 и 15,4% эксплантов, соответственно.

#### 4.2 Гистологические особенности развития эксплантов

Для выявления особенностей инициации развития эксплантов на питательной среде было проведено их гистологическое исследование. Анализ срезов показал, что прилегающий к цветкам участок стержня початка может содержать от 3 до 10 сосудов (рис. 6 *а*). На средах, где отсутствовал морфогенез, происходит постепенная дегенерация завязи, тогда как клетки стержня початка и чешуй цветка признаков дегенерации не имеют (рис. 6 *б*, *в*).

На среде с добавлением БАП геммоподобные структуры образуются на стержне початка. Сначала на поверхности фрагмента стержня над одним из проводящих пучков появляется небольшой бурогок, который постепенно увеличивается в размере и зеленеет (рис. 7.)

«Сахаристый» каллус также формируется на поверхности фрагмента стержня початка над проводящими пучками, при этом завязь в таких эксплантах, как правило, дегенерирует (рис. 8).

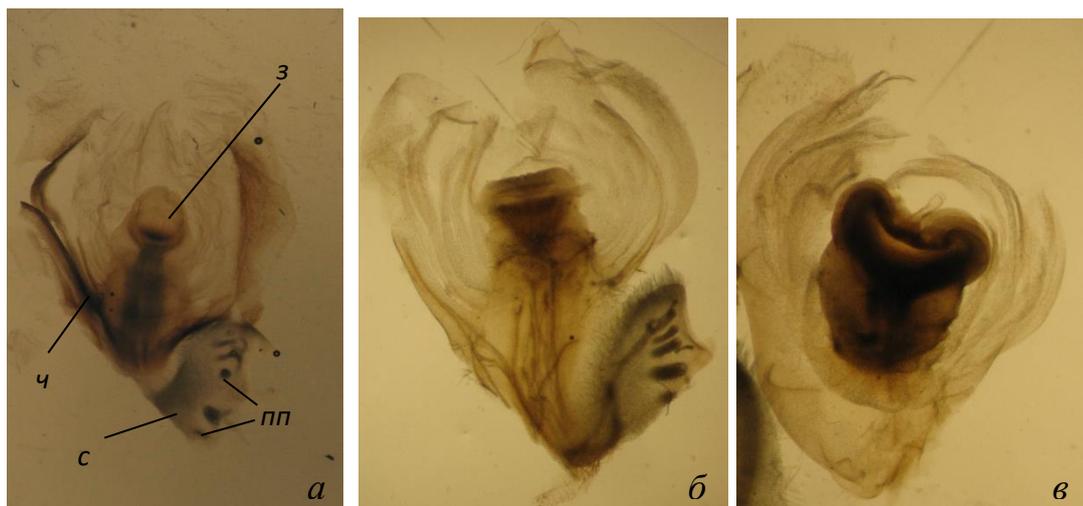


Рисунок 6 – Постепенная дегенерация завязей первичных эксплантах через 1 месяц от начала культивирования (*з* – завязь, *ч* – чашуи цветка; *с* – фрагмент стержня початка; *пп* – проводящие пучки)

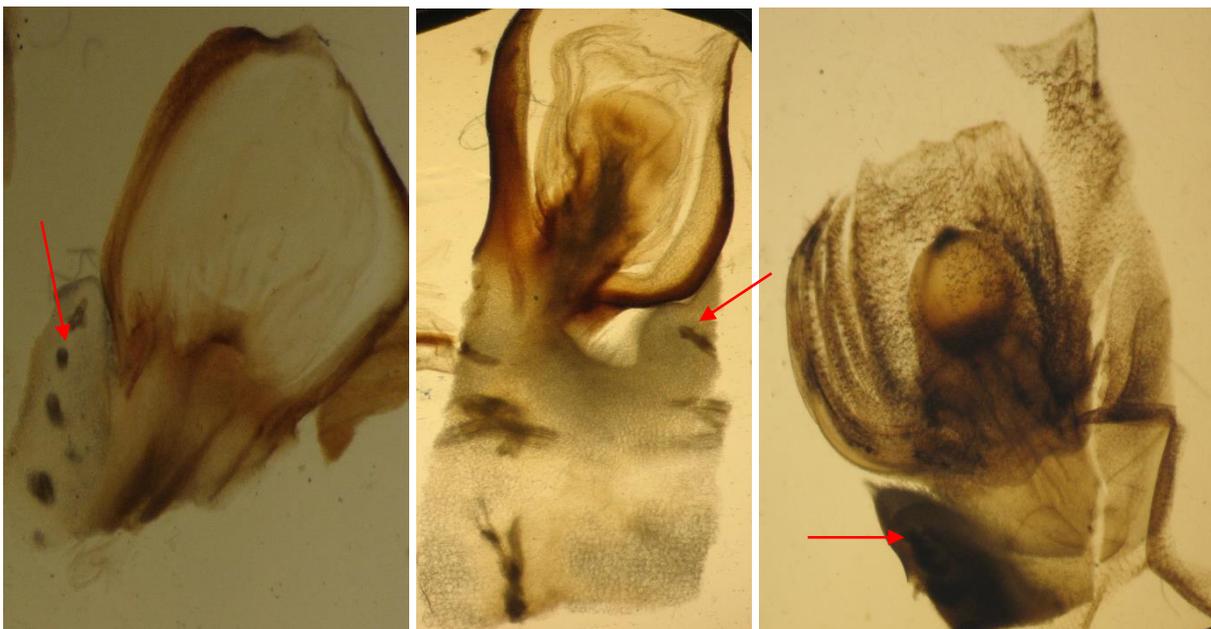


Рисунок 7 – Развитие почкоподобной структуры на поверхности фрагмента стержня початка (показано стрелкой)



Рисунок 8 – Развитие каллуса на поверхности фрагмента початка (показано стрелкой)

## ВЫВОДЫ

1. Для инициации стерильной культуры апробировано 3 типа первичных эксплантов гаплоидных растений партеногенетической линии кукурузы: 1) одиночные пестичные цветки; 2) цветок с прилегающей к нему частью стержня початка и 3) конгломерат из нескольких пестичных цветков. Начало морфогенеза зарегистрировано только при использовании в качестве первичных эксплантов цветков с частью стержня початка.

2. Наиболее эффективным вариантом стерилизации первичных эксплантов при их введении в культуру является обработка мертиолятом в течение 8 минут.

3. Из 14 апробированных питательных сред инициация прямого геммогенеза зарегистрирована с частотой 3,5% на среде MS с добавлением 100 мг/л сахарозы и 2 мг/л БАП. На среде MS, дополненной 100 мг/л сахарозы, и 4 и 6 мг/л 2,4-Д, наблюдалось начало каллусогенеза с частотой 2,5 и 15,4% соответственно.

4. Гистологический анализ эксплантов показал, что геммоподобные структуры и каллус формируются не на структурах цветка, а на участках стержня початка, расположенных над проводящими пучками. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования фрагментов стержня незрелого початка для введения в культуру *in vitro* гаплоидных растений кукурузы.

