

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

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
IN VITRO У ГАПЛОИНДУЦИРУЮЩИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

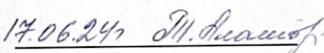
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Тюляковой Дарьи Александровны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

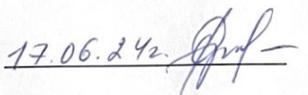
17.06.24  Т.А. Алаторцева

Научный консультант:

ведущий биолог учебно-научной лаборатории

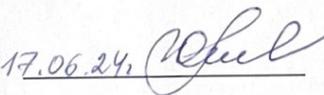
биотехнологии

и репродуктивной биологии

17.06.24  О.В. Гуторова

Зав. кафедрой:

д - р. биол. наук

17.06.24  О.И. Юдакова

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень сельскохозяйственного производства требует от селекционеров более быстрого создания новых качественных форм и сортов растений, что невозможно без привлечения современных технологий. Широкий перспективы открывает метод *in vitro*, который облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс, делает его более результативным. Использование данного метода предполагает получение каллусных штаммов, обладающих высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом и сохраняющих его в течение длительного времени. Однако многие практически ценные линии и гибриды кукурузы не всегда удаётся воспроизвести в культуре *in vitro*. К числу трудно воспроизводимых растений относятся и гаплоиды. Они необходимы селекционерам для быстрого получения гомозиготных форм. Поэтому важен поиск эффективных методов воспроизводства в стерильной культуре, не только самих гаплоидных растений, но и растений, обладающих свойствами гаплоиндукторов, стимулирующих образования гаплоидных зародышей.

В связи с чем, исследования по введению в культуру *in vitro* гаплоиндуцирующих форм кукурузы, являются актуальными и практически значимыми.

Цель настоящей работы:

Оценить возможность введения в культуру *in vitro* зрелых зародышей гаплоиндуцирующих линий кукурузы.

В задачи работы входило:

1. Подобрать эффективное средство для стерилизации посадочного материала.
2. Изучить спектр морфогенетических процессов при культивировании изолированных зародышей трёх гаплоиндуцирующих 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 линии кукурузы:

1. КМС – Коричневый маркер Саратовский (авторы Завалишина, Тырнов). Гаплоиндуктор с частотой гаплоиндукции 0,4-2,0%. Получена от скрещивания линий Stock-6 и КМ. Зерновки желтые.

2. ЗМС-8 – Зародышевый маркер Саратовский – 8 (авторы Завалишина, Тырнов). Эффективный гаплоиндуктор. Частота индукции гаплоидов от 3 до 8%. Имеет маркерный ген окраски зародыша и эндосперма *R-nj:cudu*, который позволяет выявлять гаплоиды среди сухих зерновок. Зерновки желтые с темным пятном на верхушке.

3. ЗМС-П – Зародышевый маркер Саратовский – пурпурный (авторы Гуторова, Тырнов). Эффективный гаплоиндуктор. Частота индукции гаплоидов до 10 %. Имеет маркерный ген окраски зародыша и эндосперма *R-nj:cudu*, который позволяет выявлять гаплоиды на стадии сухих семян и доминантные гены пурпурной окраски растения. Зерновки желтые с темным пятном на верхушке.

Структура и объём работы.

Работа изложена на 48 страницах машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с 1 таблицей, 13 рисунками и выводы. Список использованных источников насчитывает 54 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.

Растения, предназначенные для получения зерновок, выращивались на экспериментальном поле НПО «Сорго» по правилам селекционной работы (делянки 4 ряда по 15–20 растений). В период цветения для предотвращения незапланированного перекрестного опыления початки до появления рылец помещали под пергаментные пакеты. Для получения зерновок проводили

принудительное самоопыление. Початки хранились в сухом проветриваемом помещении.

Зародыши, предназначенные для культивирования вычленили из зрелых семян, предварительно выдержанных в коммерческом средстве «Domestos» в течении 30 минут и замоченных в стерильной дистиллированной воде на 24 часа. Далее были испытаны два варианта последующей стерилизации замоченных семян.

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 довели 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 стерилизующих растворов для обработки зародышей

Одним из направлений научно-исследовательской работы лаборатории биотехнологии кафедры генетики является разработка метода создания регенерационно – способных каллусных штаммов ряда линий кукурузы. Мы работали с тремя выше названными линиями. При попытке введения в культуру *in vitro* изолированных зародышей этих линий была выявлена высокая степень инфицированности эксплантов на питательной среде, и, следовательно, и самих зерновок. В связи с этим, была проведена работа по подбору стерилизующих растворов для зерновок каждой линии.

Было испытано 2 стерилизующих раствора: 0,5.% раствор натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты (мертиолят) и коммерческое дезинфицирующее средство «Белизна», содержащее гипохлорит натрия (в разведении 1:6). Результат стерилизации учитывался для эксплантов всех линий на всех четырёх испытанных средах. Было замечено, что результат использования стерилизующих растворов варьировал в зависимости от линий и варианта среды, отличающихся концентрацией 2,4-Д.

Так, среди зародышей линии ЗМС-8, эксплантированных на разные среды и прошедших обработку «Белизной», встречались и инфицированные и неинфицированные. Доля неинфицированных зародышей варьировала от 15,3 % до 61,5%., В то время как, после обработки мертиолятом, экспланты только на среде №4 с 2,-Д – 4,0 мг/л, оказались без инфекции (67,0 %).

Экспланты линии ЗМС – П после обработки «Белизной» неинфицированными были зародыши на всех средах с частотой от 50,0 % до 69,2 %. При использовании мертиолята пораженными инфекцией оказались все экспланты только на безгормональной среде № 1. На средах, содержащих 2,4-Д в количестве 2,0 мг/л (№ 2) и 3,0 мг/л (№3) все зародыши этой линии (100 %)

оставались чистыми. Доля зародышей на среде №4 (2,4 –Д – 4,0 мг/л) без инфекции составила 62,5 %.

При использовании «Белизны» для зерновок линии КМС все зародыши были поражены инфекцией, за исключением эксплантов на среде №2, с содержанием 2,4-Д в количестве 2,0 мг/л. Зародыши линии КМС, культивируемые на той же среде №2 также оказались чистыми. Их количество составило 33,3 %.

Исходя из результатов этой части работы, можно констатировать, что состав питательной среды практически не сказывается на стерилизующих свойствах «Белизны». В то время, как лучшей эффект стерилизации с использованием мертиолята достигается на средах с более высоким содержанием 2,4 -дихлорфеноксиуксусной кислоты, то есть от 2,0 мг/л до 4,0 мг/л.

2 Анализ спектра морфогенеза у культивируемых зародышей

В процессе наблюдения за культивируемыми зародышами было установлено, что у выживших и неинфицированных эксплантов наблюдается тенденция к образованию каллуса двух типов: ризогенного, и глобулярного (морфогенного). Ризогенный каллус на всех испытанных средах был способен формировать только корни, покрытые волосками и при периодической пересадке на другие среды, того же состава или на среды, содержащие цитокинины, вновь проявлял тенденцию только к корнеобразованию.

Было зафиксировано также и образование каллуса глобулярного типа. Он состоял из комплекса глобулярных структур, часто желтоватого цвета. При пересадке на свежую среду этот комплекс из глобул мог распадаться на отдельные структуры.

Образование каллуса как ризогенного, так и морфогенного, было возможным на разных этапах развития зародыша на питательной среде. Каллус мог образовываться, когда зародыш ещё не начал прорастать, тогда каллус формировался от поверхности щитка.

Если у прорастающего зародыша уже появился coleoptile, то от его поверхности также происходила индукция каллусогенеза.

Были отмечены случаи, когда каллусогенез, происходил одновременно на двух поверхностях экспланта (от щитка зародыша и на coleoptile).

Были отмечены также случаи образования каллуса, который мы назвали как «мокрый». Он имел влажную блестящую поверхность, не проявлял тенденции к какому-либо направлению дифференциации и позднее дегенерировал.

Исходя из выше сказанного, можно заключить, что при культивировании зрелых зародышей кукурузы, возможна индукция как морфогенного (глобулярного), так и ризогенного каллусов у всех линий, что будет представлено ниже.

3 Влияние генотипа и состава среды на индукцию каллусогенеза

Принимая во внимание результаты стерилизации зародышей растворами «Белизны» и мертиолята и использования питательных сред с разным количеством ауксина 2,4 –Д (от 0 до 4,0 мг/л), было принято решение выбрать для дальнейшего культивирования только 2 варианта питательной среды: №2 (2,4-Д – 2,0 мг/л) и №3 (3,0 мг/л). В качестве стерилизующего был выбран раствор средства «Белизна». Мертиолят решено не использовать по причине негативного действия на культивируемые экспланты. Зародыши в этом случае теряли жизнеспособность и подвергались некрозу.

Было отмечено, как указывалось выше, образование двух типов каллуса ризогенного, формирующего только корни и глобулярного, обладающего тенденцией к формированию растений.

Установлено, что ризогенный каллус формируется у зародышей линий ЗМС-8 только на среде №2 с частотой 55,5% и линии ЗМС – П на среде №2 с частотой 19, 2% и среде №3 с частотой 14,3%. У линии КМС этот тип каллуса был обнаружен на среде №3 у 43,2 % эксплантов.

Что касается глобулярного каллуса, то мы полагаем, что это – морфогенный каллус. Его появление было отмечено у линии ЗМ -8 только на

среде №2 с частотой 43,0 %. У линии – на обеих средах №2 (частота 3,8%) и №3 (частота 14,3%). В то время как у линии КМС только на среде №3 (частота 47,7%).

Таким образом, формирование этих двух типов каллуса было возможным для каждой линии на одинаковых средах и приблизительно с одинаковой вероятностью. Исключением является линия ЗМС-П, у которой несколько ниже (3,8 %) была вероятность развития глобулярного каллуса на среде с содержанием 2,4-Д (2,0 мг/л) по сравнению со средой №3 (14,3%) с концентрацией 2,4-Д – 3,0 мг/л.

Наблюдение за эксплантами на ранних этапах каллусогенеза, как уже говорилось выше, показало, что каллус обоих типов может формироваться на разных частях культивируемого зародыша: либо от области щитка, либо на поверхности колеоптиля прорастающего зародыша, либо одновременно на двух поверхностях.

Зародыши линии ЗМС-8 продуцируют каллус от щитка на всех средах, за исключением безгормональной. Достоверно более высокие частоты – по 93 % отмечены на средах №2 и №3 и ниже частота – 69, 2% на среде №4. Каллус от поверхности колеоптиля появился с частотой 15,4 % только на среде №4.

У зародышей линии ЗМС-П, каллус от щитка был обнаружен на среде №2 (частота 57,1%), с заметно более низкой частотой на среде №3 и полностью отсутствовал у зародышей этой линии на безгормональной среде и среде №4.

Экспланты линии КМС продуцировали каллус от щитка на средах №1, №2, №3 при минимальной частоте, 14,3 % на среде №1 и максимальных частотах 50,0 % и 42,% (среды №2 и №3). Формирование каллуса от щитка проходило менее интенсивно и отмечалось на средах №2 и №3 с частотами 16,6% и 14,3 %, соответственно.

Приведенные результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что индукция каллусогенеза, как от щитка, так и от колеоптиля имеет место у зародышей всех исследуемых трёх линий, но частота их

проявления зависит как от донорной линии эксплантов, так и от варианта питательной среды.

ВЫВОДЫ

1. Для стерилизации зерновок, предназначенных для получения зародышей, эффективным является использование коммерческого дезинфицирующего средства «Белизна», не вызывающего некротических явлений у эксплантов, по сравнению с водным раствором натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты.

2. В случае применения раствора «Белизна» для обработки семян сохраняется жизнеспособность зародышей и отмечается индукция каллусогенеза от изолированных зародышей.

3. При культивировании зародышей всех трёх линий установлено два типа каллусогенеза (ризогенный и морфогенный глобулярного типа).

4. Частота глобулярного каллусогенеза (важного для получения регенерантов) зависит от состава питательной среды и генотипа донорных линий и может варьировать у линии ЗМС - 8 от 0% (среда №3) до 43,0% (среда № 2), у линии ЗМС – от 3,6 % (среда №2) до 14,3% (среда №3), у линии КМС – от 0 на среде № 2 до 47,7% на среде № 3).

 (Имя)