

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

Кафедра генетики

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ И
ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ ПАСЛЁНОВЫХ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Потехиной Анастасии Витальевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

4.06.2019г.  Т.А. Алаторцева

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

4.06.2019  О.И. Юдакова

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Одним из подходов в исследовании морфогенеза является его индукция в культуре изолированных органов растений. Вычленение из интактного растения и культивирование в стерильных условиях отдельных органов или их частей ведёт к устранению влияния организма, а следовательно, может способствовать реализации других морфогенетических программ.

Модельные системы развития вегетативных и генеративных органов, созданные с использованием методов *in vitro*, дают возможность исследовать процессы дифференциации в контролируемых условиях, что необходимо для выяснения роли факторов, детерминирующих морфогенез и определения степени его зависимости от внешних условий. Подобные модели могут быть использованы в ботанических, физиологических и селекционных исследованиях.

В связи с этим работа, посвященная изучению процесса морфогенеза в культуре листовых эксплантов и неопыленных завязей у представителей семейства Solanaceae является актуальной и практически значимой.

Новизной данного эксперимента следует считать исследование феномена циклического воспроизводства генеративных структур в условиях *in vitro*.

Цель работы: Оценить перспективы использования разных типов эксплантов некоторых сортов калибрахоа, петхоа, петунии и табака при введении в культуру *in vitro*.

В задачи исследования входило:

1. Определить направления морфогенеза в культуре эксплантированных листьев и неопылённых завязей представителей семейства Solanaceae.
2. Оценить возможность получения растений-регенерантов в культуре

всех донорных форм (петунии, калибрахоа, петхоа и табака).

3. Сравнить спектр морфогенетических новообразований при культивировании двух типов (с покровами и без покровов) неопыленных завязей табака.
4. Определить роль апробированных вариантов питательной среды для индукции морфогенеза *in vitro*.

Материал и методы

Материал исследования

Объектами исследования являлись растения: петуния *Petunia x hybrida* Vilm. (Crazytunia Mix); калибрахоа *Calibrachoa* Cerv (сорта: Kabloom Deep Blue и Kabloom Deep Pink); петхоа *Petchoa* hybrid (Beautica Caramel Yellow); табак *Nicotiana tabacum* L. трёх сортов: Белолист, Приднестровский, Самсун.

Методы исследования. Растения калибрахоа, петхоа, петунии выращивали в горшечной культуре в условиях оранжереи, табака – в условиях открытого грунта. Молодые листья петунии, калибрахоа петхоа, и цветки табака в момент раскрытия бутона, срезали со здоровых растений. Завязи в момент срезки бутонов содержали зрелые зародышевые мешки.

Части растений, предназначенные для культивирования обрабатывали дезинфицирующими средствами: 70%-ным этанолом и раствором (50 мг/л) натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты (с добавлением Twin 80).

Из простерилизованных листовых пластинок вырезали фрагменты размером 0,5 x 0,5 см. Для культивирования использовались завязи с покровами и без покровов. питательной среды. Культивирование проводили в пробирках с 7 мл при 25±2°C и 16-часовом фотопериоде.

Питательные среды включали: макроэлементы (1/2 концентрации) и микроэлементы по Мурасиге и Скугу, тиамин – 0,5 мг/л; пиридоксин – 0,5 мг/л; никотиновую кислоту – 1,0 мг/л; аскорбиновую кислоту – 1,0 мг/л; глицин – 1 мг/л, мезоинозит – 70 мг/л. сахарозу – 20 мг/л, а также агар-агар – 7000 мг/л и разные варианты концентраций ауксина ИУК и цитокинина 6-БАП. Для культивирования листовых эксплантов были протестированы 3 варианта: №

1 (ИУК – 0,5 мг/л, БАП – 0,5 мг/л); № 2 (ИУК – 0,5 мг/л, БАП – 1,0 мг/л); № 3 (ИУК – 1,0 мг/л, БАП – 1,0 мг/л). Вариант № 4 (ИУК – 1,0 мг/л, БАП – 2,0 мг/л) – для культивирования завязей табака.

Перед автоклавированием pH среды во всех случаях доводили раствором NaOH до уровня 5.8 – 6.1.

Анализ культивируемых объектов осуществляли с использованием микроскопа МБС-9 и Stemi 2000 – С. Микрофотосъёмку проводили с помощью фотокамеры Canon PC 1200 и компьютерного программного обеспечения Canon Utilities ZoomBrowser EX 5.7).

Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей.

Результаты исследования. Культура листовых эксплантов

В ходе проведённого эксперимента было замечено, что в целом для листовых эксплантов всех исследованных донорных растений (калибрахоа, петхоа и петунии) характерны: каллусогенез (морфогенный и неморфогенный) и геммогенез. При этом на одном экспланте иногда можно было отметить сочетание морфогенетических процессов.

Каллусогенез. Неморфогенный бело-зелёной окраски каллус формировался, как следует из рисунка 1, по краю среза листового экспланта и постепенно увеличивался в объёме.

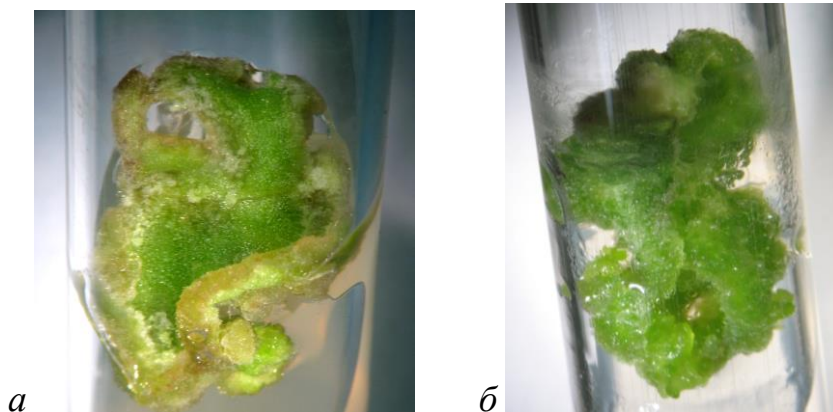


Рисунок 1 – Раневой каллус по краю листового экспланта: *a* – *Petunia x hybrida* Vilm. *Crazytunia Mix*; *б* – *Calibrachoa* Cerv. *Kabloom Deep Pink* в условиях культуры *in vitro*

Как правило, далее такой каллус дегенерировал без какой-либо трансформации. Растения-регенеранты из неморфогенного раневого каллуса не развивались.

Формирование морфогенного каллуса начиналось с развития по краю среза экспланта «бугорчатых» и далее шаровидных структур, которые постепенно увеличивались в количестве и размерах и, морфогенная каллусная ткань занимала значительный объём пробирки.

Позже отдельные глобулярные структуры морфогенного каллуса начинали трансформироваться в вегетативные почки, что изображено на рисунке 2.

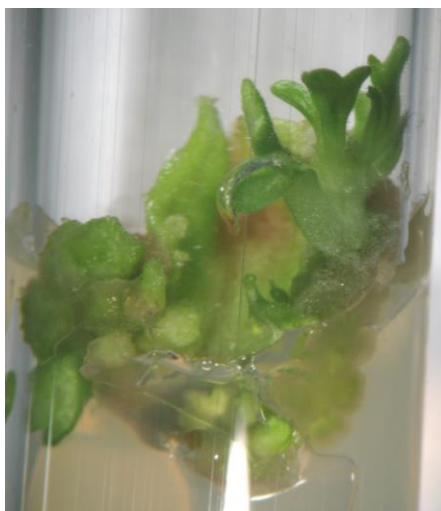


Рисунок 2 – Развитие вегетативных почек из морфогенного каллуса на листовом экспланте *Petchoa hybrid Beautica Caramel Yellow*

Геммогенез. При прямом геммогенезе почки возникали непосредственно из клеток ткани листовой пластинки из центральной её части или по краю среза.

Однако, как отмечалось выше, можно было наблюдать их возникновение из глобулярных структур морфогенного каллуса. Геммогенез на некоторых эксплантах носил массовый характер. Чаще всего это отмечали на листовых эксплантах петунии и петхоа. В пробирках развивались растения-регенеранты

в большом количестве. Процесс формирования регенерантов происходил в пробирках на питательной среде без пересадки в исходном пассаже.

Растения – регенеранты, развившиеся путем прямого геммогенеза или опосредованно через каллус (рисунок 3), при пассировании на свежую питательную среду и ИУК (0,5 мг/л) и прежним основным составом формировали корневую систему и были готовы к пересадке в грунт.

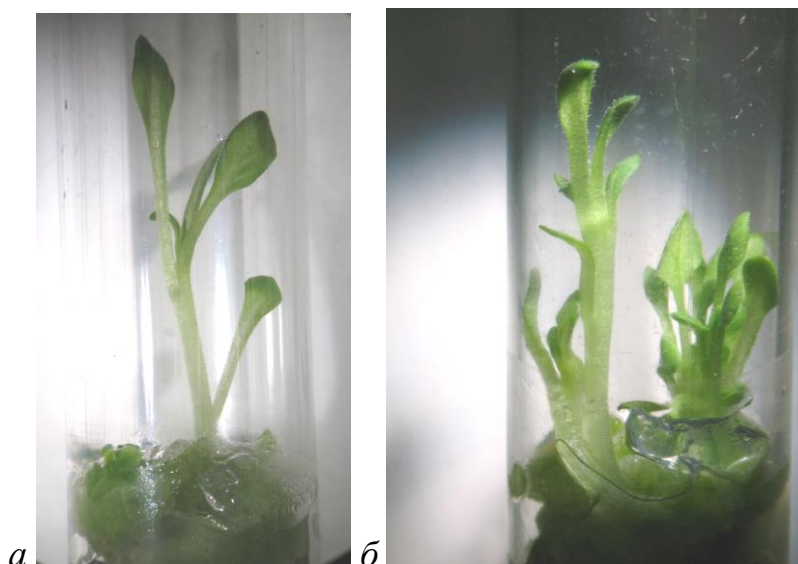


Рисунок 3 – Растение-регенерант, полученный в культуре листовых эксплантов: – *Petchoa hybrid Beautica Caramel Yellow*; б – *Petunia x hybrida* Vilm. *Crazytunia Mix*

Можно отметить, что экспланты всех исследуемых донорных генотипических форм проявляют сходные морфогенетические тенденции апробированных условиях изолированной стерильной культуры.

Изучение влияния питательной среды на пути морфогенеза

В эксперименте были протестирована морфогенетическая активность листовых эксплантов четырёх названных донорных форм на трёх вариантах питательной среды. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

В ходе наблюдения за листовыми эксплантами было замечено, что направленность и интенсивность морфогенетических процессов не всегда зависят от состава данной питательной среды.

Как отмечалось ранее, появление разных типов каллуса можно было наблюдать на одном и том же экспланте, при этом процессы неморфогенного

и морфогенного каллусогенезов происходили с разной интенсивностью у разных доноров на идентичных средах. Следует отметить, что интенсивность и вероятность проявления морфогенного каллусогенеза у каждого из названных объектов достоверно не различались на средах с разным соотношением фитогормонов. Вероятность индукции прямого геммогенеза варьировала у разных доноров на разных средах.

Таблица 1 – Зависимость морфогенеза от используемых концентраций фитогормонов в питательной среде

Генотипы	Питательная среда		Неморфогенный каллусогенез, %	Морфогенный каллусогенез, %	Прямой геммогенез, %	Регенерация растений, %
	№ варианта	Фитогормоны, мг/л				
<i>Petchoa hybrid</i> <i>Beautica Caramel</i> <i>Yellow</i>	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	42,9	38,1	14,3	19,1
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	88,9	33,3	22,2	16,7
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	87,0	34,8	17,4	21,4
<i>Calibrachoa</i> <i>Cerv. Kabloom</i> <i>Deep Blue</i>	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	11,4	14,2	9,8	7,4
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	12,3	15,3	15,3	6,4
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	10,6	16,6	6,1	7,2
<i>Calibrachoa</i> <i>Cerv. Kabloom</i> <i>Deep Pink</i>	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	51,3	17,6	5,2	3,9
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	62,2	22,1	11,1	4,9
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	95,4	15,5	6,3	5,7
<i>Petunia x hybrida</i> <i>Vilm. Crazytunia</i> <i>Mix</i>	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	67,4	40,3	37,2	37,8
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	57,2	38,3	42,1	46,9
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	73,2	41,5	53,7	52,7

Процесс развития регенерантов имел место у эксплантов всех исследуемых доноров на всех апробированных вариантах питательной среды.

Все исследованные донорные формы петхоа и калибрахоа положительно реагировали на условия *in vitro* и могут быть использованы для клонального микроразмножения.

Культура неопылённых завязей табака

При использовании в качестве эксплантов неопыленных завязей табака с покровами и без покровов был выявлен спектр морфогенетических процессов, который несколько различался у этих двух видов эксплантов. Результаты наблюдений представлены в таблице 2.

Наблюдение за эксплантированными завязями показало, Кроме вегетативных почек на поверхности эксплантированных завязей от покровов и плаценты, могли развиваться пестикоподобные структуры (пестиллоиды) с простыми или разветвлёнными столбиками, от плаценты, – структуры напоминающие цветок, а также отдельные элементы цветка (рисунок 4).

К их числу можно отнести: лепестки и сросшиеся пестики, расположенные изолированно или внутри воронковидного «венчика». На поверхности таких цветкоподобных элементов (ЦПС) формировались «семязачатки», хотя на самой плаценте семязачатки *de novo* не появлялись.

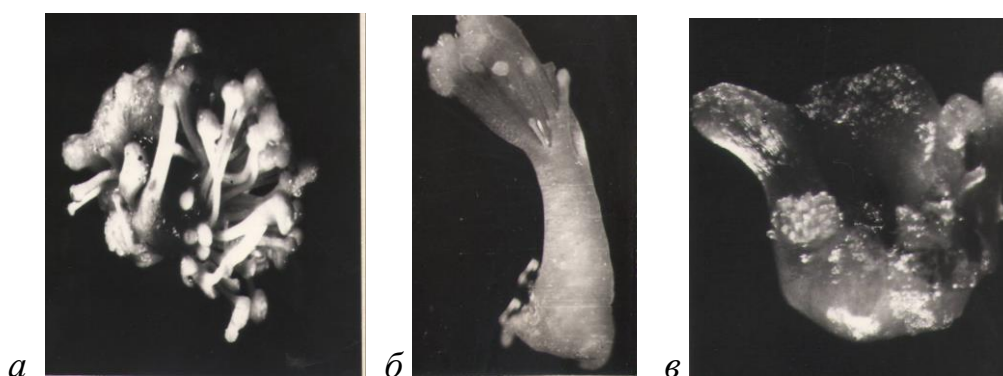


Рисунок 4 – Флоральный морфогенез в культуре неопыленных завязей табака: *а* – пестиллоиды; *б* – «цветок» из сросшихся пестиллоидов; *в* – «венчик» с семязачатками, возникшими *de novo*

Таким образом, происходила трансформация тканей покровов завязи в плацентарную ткань, формирующую каллус и генеративные структуры, пестиллоиды. Иногда можно было наблюдать появление из-под лопнувших

покровов завязей увеличившиеся в размерах семязачатки. На их поверхности возникали семязачатки следующего поколения (сорт Самсун) и пестиллоиды. При пересадке групп «дочерних» семязачатков на свежую среду того же

Таблица 2– Результаты культивирования неопыленных завязей табака. Основные направления морфогенетических процессов

Сорт табака	Фитогормоны, мг/л	Тип экспланта, завязей	Каллус покровов завязей, образующий		Плацента, формирующая				Исходные семязачатки, трансформирующиеся в			
			*ВП	*Пстл	Каллус	*СЗІ	*ЦПС	Пстл	Пстл	СЗІ	СЗІ → СЗ ІІ	ЦПС
Белолист	ИУК – 1,0	с покровами	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	БАП – 2,0	без покровов	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Приднестровский	ИУК – 1,0	с покровами	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	БАП – 2,0	без покровов	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Самсун	ИУК – 1,0	с покровами	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	БАП – 2,0	без покровов	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+

* ВП – вегетативные почки.

Пстл – пестиллоиды.

СЗІ – семязачаток, появившиеся *de novo* от исходных семязачатков.

СЗІ→ СЗІІ – семязачаток, производный от исходного, продуцирующий *de novo* следующее поколение семязачатков.

ЦПС – цветкоподобная структура.

состава процесс репродукции пестикоподобных и семязачаткоподобных структур возобновлялся. При сохранении покровов у завязей, на их поверхности появлялся каллус, из которого возникали вегетативные почки. Последние развивались в нормальные растения. После пересадки на среду для укоренения (ИУК-0,5 мг/л) регенеранты формировали нормальную корневую систему, необходимую для пересадки растений в грунт.

Культивирование неопылённых завязей табака без покровов

При использовании в качестве эксплантов завязей с удалёнными покровами, когда семязачатки открыто располагались на плаценте, были получены несколько иные результаты, чем при культивировании завязей с сохранённой покровной тканью (таблица 2). В отсутствие покровов у завязей преобладал процесс трансформации семязачатков, что показано на рисунке 5.

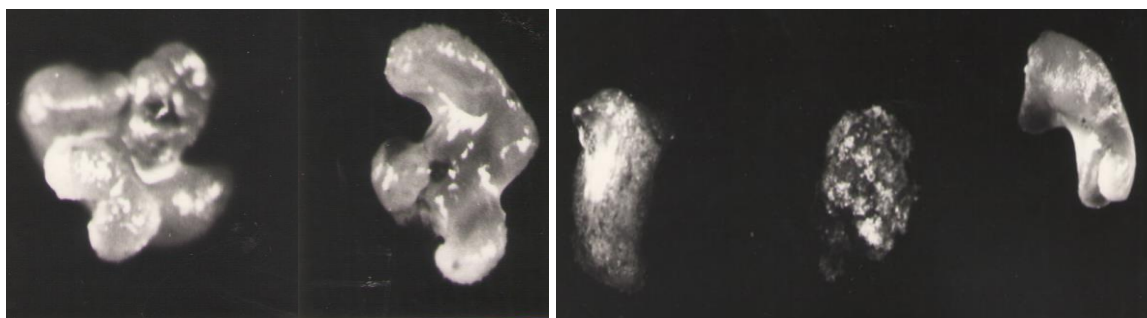


Рисунок 5– Трансформация семязачатков в культуре неопылённых завязей табака

При этом развитие вегетативных почек не происходило. Семязачатки, находясь на плаценте, активно трансформировались либо в цветкоподобные и пестикоподобные структуры, либо «отпочковывали» семязачатки следующего поколения, как изображено на рисунке 6.

При пересадке дочерних семязачатков на среду того же состава, процесс вновь циклично повторялся (у сортов Приднестровский и Самсун). В ходе эмбриологического анализа в единичных «дочерних» семязачатках были обнаружены нормально развитые зародышевые мешки. Таким образом, в данных условиях культивирования неопылённых завязей были зарегистрированы следующие морфогенетические процессы: каллусогенез, образование семязачатков, пестиллоидов и вегетативных почек.

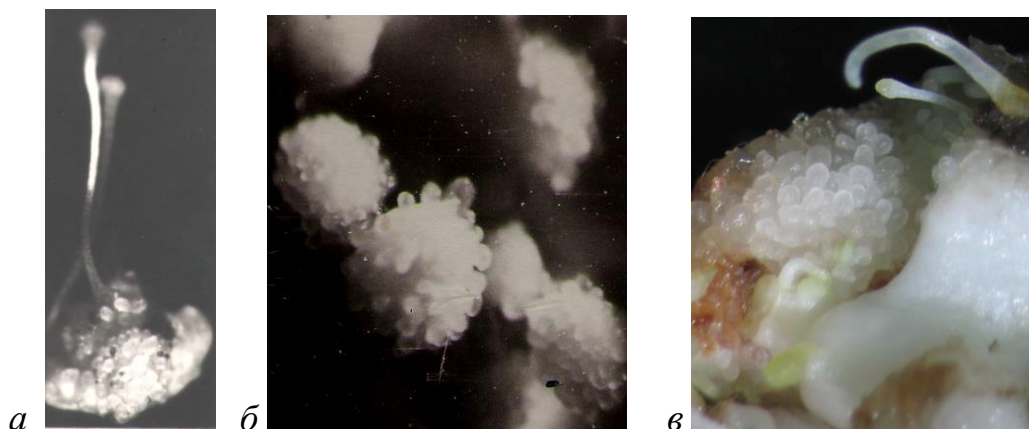


Рисунок 6 – Формирование «дочерних» семязачатков на поверхности пестиллоидов (а) и исходных трансформированных семязачатков (б,в) в культуре неопылённых завязей табака

Несмотря на то, что рядом авторов уже было зарегистрировано формирование генеративных структур, подобных пестиллоидам, но циклическое воспроизводство семяпочек мы наблюдали впервые.

Результаты нашего эксперимента дают основание считать, что условия культуры *in vitro* у всех исследуемых гибридов и сортов при инокуляции одинаковых эксплантов вызывают идентичный спектр морфогенетических реакций. Существующие различия в большей степени определяются генотипом доноров и в меньшей степени гормональным составом апробированных питательных сред.

ВЫВОДЫ

- 1 При культивировании листовых фрагментов всех доноров (петунии, калибрахоа, петхоа) на всех трёх испытанных средах отмечены пути морфогенеза: каллусогенез (неморфогенный и морфогенный), формирование вегетативных почек, или геммогенез (прямой и опосредованный через каллус).
- 2 При использовании в качестве эксплантов неопылённых завязей табака морфогенез происходил в следующих направлениях: каллусогенез, образование семязачатков, пестиллоидов и вегетативных почек.
- 3 В культуре эксплантированных листьев и неопыленных завязей всех изученных представителей семейства Solanaceae была отмечена регенерация растений путём геммогенеза (прямого или через каллус).
- 4 К основным отличиям в результатах культивирования двух типов завязей следует отнести следующее: только при наличии покровов происходило формирование каллуса, вегетативных почек и далее растений регенерантов на поверхности экспланта, на плаценте таких завязей семязачатки *de novo* не формировались. В отсутствие покровов у завязей преобладал процесс трансформации семязачатков, случаев регенерации растений не обнаружено.
- 5 Существующие различия в спектре морфогенетических процессов в большей степени определяются генотипом доноров и в меньшей степени гормональным составом апробированных питательных сред.

