

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

Кафедра генетики

**КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ
НЕКОТОРЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 422 группы


Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Дроздовой Маргариты Сергеевны

Научный руководитель:


д.б.н., доцент

01.06.2023 

О.И. Юдакова

Зав. кафедрой:

д.б.н., доцент

01.06.2023 

О.И. Юдакова

Саратов 2023

Введение

Кукуруза (*Zea mays* L.) – широко выращиваемая зерновая культура в современном мире, имеющая значимую продовольственную ценность. В связи с этим актуальным является получение новых сортов кукурузы при помощи современных методов генетической инженерии, значительно сокращающих сроки выведения новых форм. Получение растений-регенерантов – важный и трудоёмкий этап в экспериментах по генетической трансформации. В связи с этим необходим поиск наиболее отзывчивых к культуре *in vitro* линий, обладающих высоким морфогенетическим потенциалом.

Цель работы: выявить особенности каллусогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Определить наиболее оптимальный тип экспланта для введения в культуру.
- 2) Определить наиболее оптимальный состав среды и индукторов морфогенеза для инициации каллусогенеза.
- 3) Установить максимально возможную продолжительность культивирования каллусных культур.
- 4) Подобрать оптимальный состав сред для индукции соматического эмбриогенеза.

Структура и объем работы:

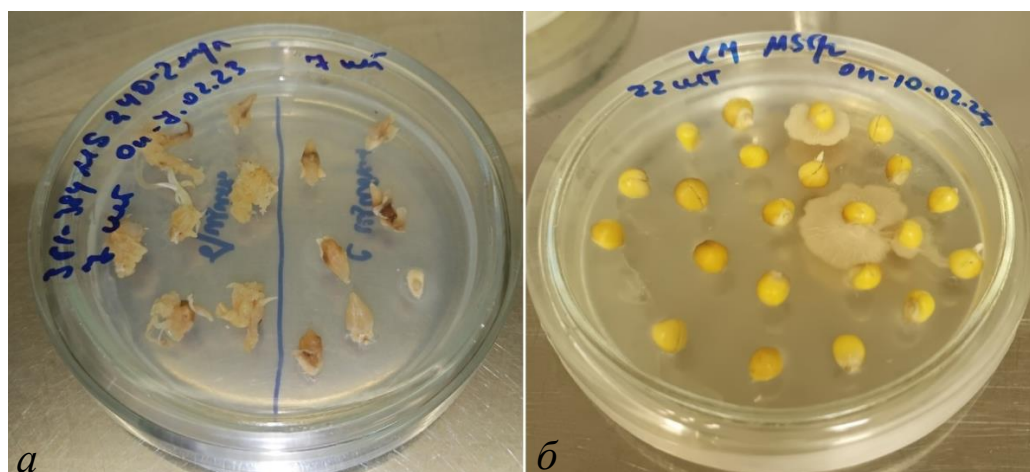
Выпускная квалификационная работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть работы включает три главы: обзор литературы, материал и методы, результаты исследования.

Основное содержание ВКР:

Объектом исследования послужили две линии кукурузы: АТТМ (*y, lg, bm, wx*) и КМ. В качестве первичных эксплантов использовали зародыши без щитка, зародыши со щитком и цельные зерновки. В качестве трансплантатов

использовали каллусы. Растительный материал обрабатывали стерилизующими растворами в стерильных условиях ламинар-бокса и переносили на искусственную питательную среду MS, дополненную фитогормонами в различных концентрациях и соотношениях. Культивирование проводили в климатоканере Sanyo в темноте при 27°C – для индукции каллусогенеза и в световой климатоканере при температуре +24±2°C и 16-часовом фотопериоде – для индукции регенерации растений из каллусов. Для проведения гистологического анализа материала при помощи микротома готовили постоянные препараты, окрашенные гематоксилином

В работе в качестве первичных эксплантов были апробированы зародыши без щитка, зародыши со щитком и целые зерновки (рисунок 1).



a – зрелые зародыши линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) без щитка и со щитком,

б – целые зерновки линии КМ

Рисунок 1 – Первичные экспланты

На среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, образование каллуса наблюдали только при использовании в качестве первичных эксплантов зародышей без щитков. Через 2 недели от начала культивирования в районе колеоптилярного узла формировался желтый плотный каллус. При пассировании на питательную среду того же состава целых зерновок и зародышей со щитком у изученных

линий образования каллус не происходило. В редких случаях на начальных этапах культивирования наблюдали только набухание зародышей без последующих изменений. Через 2 недели культивирования растительный материал дегенерировал. В связи с этим далее в эксперименте в качестве первичных эксплантов использовали только зрелые зародыши без щитков, как надёжных продуцентов каллусов.

Для того, чтобы установить наиболее эффективную питательную среду для индукции каллусогенеза было апробировано 4 варианта состава среды: 1) MS без добавления гормонов (контроль); 2) MS, дополненная 2 мг/л 2,4-Д; 3) MS, дополненная 2,5 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП; 4) MS, дополненная 2,5 мг/л 2,4-Д и 2,5 мг/л БАП. Последние два варианта были выбраны в связи с тем, что они ранее показали высокую эффективность при культивировании зрелых зародышей у тропических инбредных линий кукурузы.

На среде без добавления гормонов через две недели культивирования наблюдали прорастание coleoptilya, каллусогенез отсутствовал.

При сочетании в среде БАП и 2,4-Д через 2 недели культивирования на зародышах обеих линий наблюдали формирование небольшого рыхлого прозрачного водянистого неморфогенного каллуса. Кроме того, у зародышей линии КМ происходила витрификация тканей. Через 3 недели культивирования, несмотря на формирование каллуса, зародыши постепенно дегенерировали.

Наиболее оптимальной средой для инициации культуры зрелых зародышей оказалась среда MS, дополненная 2,0 мг/л 2,4-Д. На этой среде приживаемость первичных эксплантов составила для линии КМ $88,08 \pm 0,2\%$ и для линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) $87,5 \pm 0,3\%$. Среди прижившихся зародышей подавляющее большинство ($88,1 \pm 0,4$ и $87,5 \pm 0,4$, соответственно) через 1 неделю культивирования на среде MS, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, увеличивалось в размерах, как бы «раздувались», и через 2 недели у них развивался coleoptilya и зародышевый корень (рисунок 2, 3). Одновременно с этим примерно у половины из проросших зародышей ($38,5 \pm 0,5$ и $57,1 \pm 0,2\%$,

соответственно) в области колеоптилярного узла формировался небольшой каллус. У единичных зародышей развивался только побег без корня, каллусы на таких эксплантах не формировались.

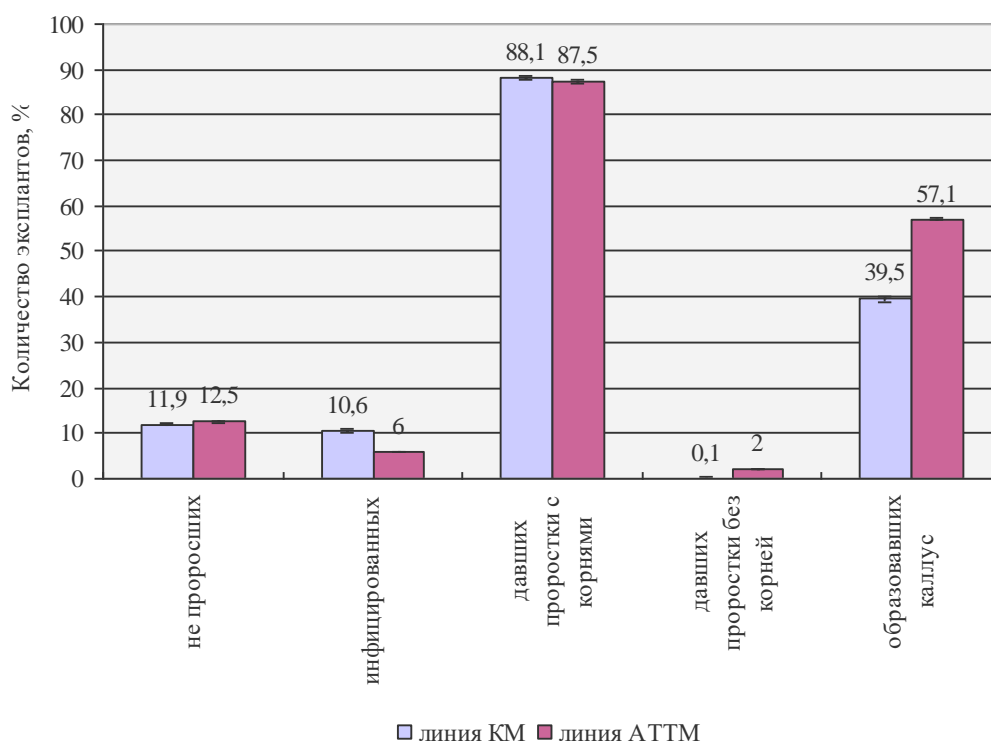


Рисунок 2 – Состояние эксплантов через 2 недели культивирования на среде MS, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д

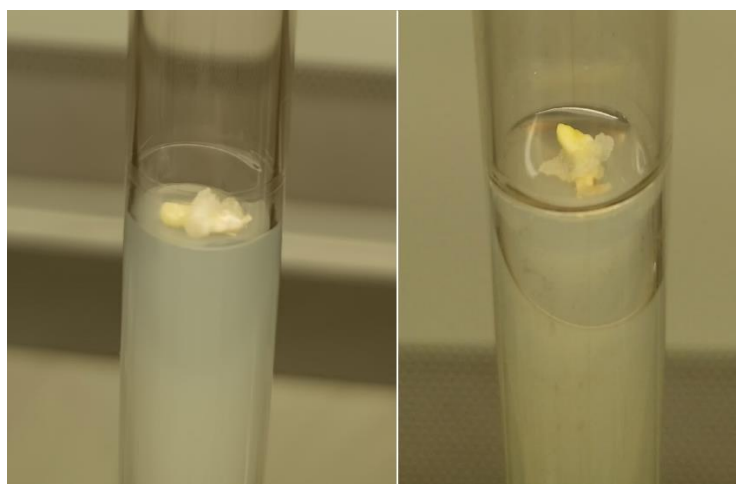


Рисунок 3 – Зародыши линии КМ через две недели культивирования на среде MS, дополненной 2мг/л 2,4-Д

Через 3–4 недели первичного культивирования были зафиксированы различия в интенсивности каллусогенеза у линий КМ и АТТМ (у, lg, bm, wx). У зародышей линии КМ каллусогенез наблюдали с частотой $38,5 \pm 0,5\%$, а у линии АТТМ (у, lg, bm, wx) – с частотой $57,1 \pm 0,2\%$.

Существуют работы, где отмечают зависимость интенсивности роста растительного материала от сезона введения в культуру *in vitro*, поэтому на наших линиях также было изучено влияние сезона посадки на частоту инициации зародышей в культуре *in vitro*. Зрелые зародыши вводили в культуру в разные сезоны: осенью, зимой и весной. Анализ частоты образования каллусов показал отсутствие влияния сезона введения в культуру на процесс инициации каллусообразования (рисунок 4).

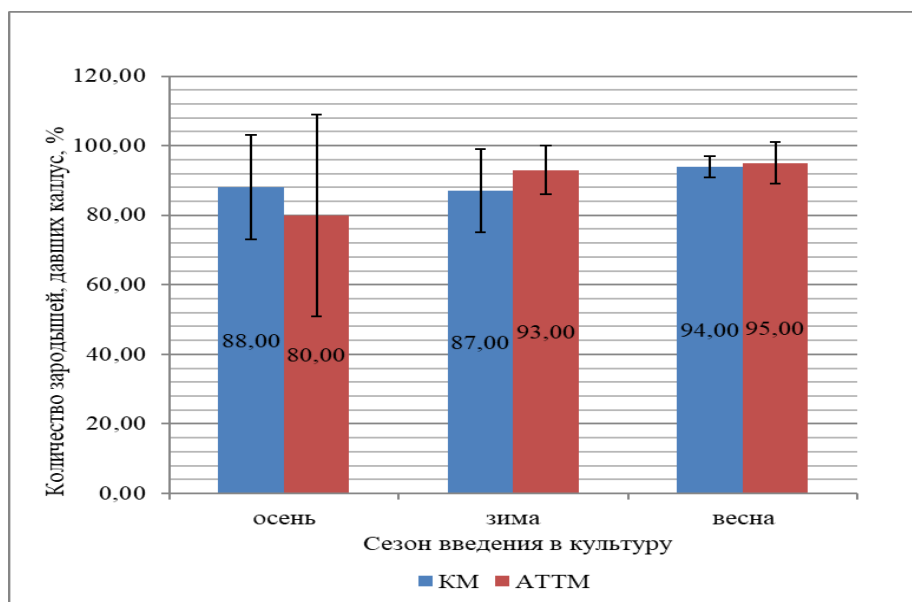


Рисунок 4 – Частота инициации изолированных зародышей в различные сезоны введения в культуру

Для индукции регенерации растений из каллусной культуры были использованы 11 вариантов искусственных питательных сред с различными концентрациями и соотношениями фитогормонов: 1) MS без гормонов; 2) MS с добавлением 0,5; 2,0 мг/л кинетина; 0,5 и 2,0 мг/л БАП; 3) MS с добавлением 2,0 мг/л кинетина и 2,0 мг/л БАП; 4) MS с добавлением 2,0 мг/л кинетина и 2,0 мг/л 2,4-Д; 5) MS с добавлением 1,5 мг/л БАП и 2,5 мг/л 2,4-Д; 6)

MS с добавлением 6,0 мг/л БАП; 7) MS с добавлением 6,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК; 8) N6 с добавлением 6,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК (таблица 1).

Таблица 1 – Среды для индукции регенерации морфогенных структур

Состав питательной среды		Линия			
Минеральный состав	Индукторы морфогенеза, мг/л	АТТМ		КМ	
		геммогенез	ризогенез	геммогенез	ризогенез
MS	без гормонов	-	+	-	-
	0,5 кинетин	-	-	-	+
	2,0 кинетин				+
	0,5 БАП	-	-	-	+
	2,0 БАП	-	-	-	+
	2,0 БАП, 2,0 кинетин	-	-	-	-
	2,0 кинетин, 2,0 2,4-Д	-	-	-	-
	1,5 БАП и 2,5 2,4-Д	-	+	-	-
	6,0 БАП	-	-	-	-
	6,0 БАП 2,0 НУК	+	+	-	-
N6	6,0 БАП 2,0 НУК	+	+	-	-

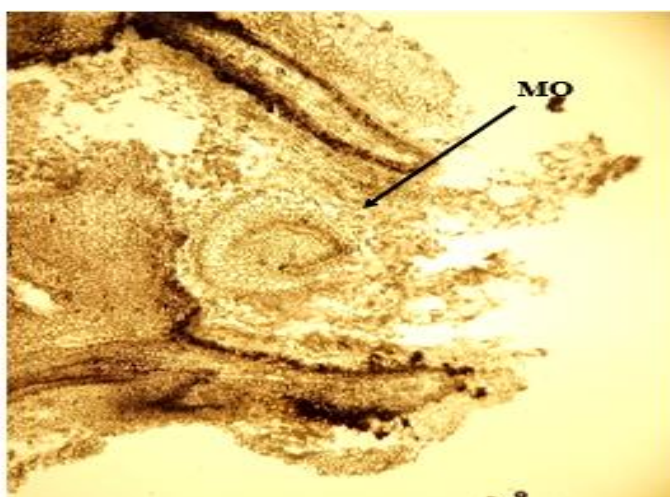
Примечание – «-» – не наблюдали данный путь морфогенеза; «+» – наблюдали данный путь морфогенеза

В качестве контроля каллусы линий АТТМ (*y*, *lg*, *bm*, *wx*) и КМ были посажены на среду MS без добавления гормонов для оценки возможности формирования морфогенных структур без дополнительных индукторов роста. Через две недели культивирования на данной среде у каллусов линии АТТМ (*y*, *lg*, *bm*, *wx*) зафиксировали образование корней (рисунок 5), тогда как каллусы линии КМ остались без изменений.

Были приготовлены постоянные препараты каллусов линии АТТМ (*y*, *lg*, *bm*, *wx*), культивируемые на среде MS без добавления гормонов, для изучения процессов закладки меристематических очагов. Анализ полученных срезов показал, что меристематические очаги формируются эндогенно в толще каллуса, что характерно при закладке корней (рисунок 6).



Рисунок 5 – Индукция непрямого ризогенеза у каллусов линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) после переноса со среды MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, на среду MS без добавления гормонов через две недели культивирования



МО – меристематический очаг

Рисунок 6 – Срез каллуса линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*), культивируемого в течение трёх недель на среде MS без добавления гормонов

На средах MS с добавлением кинетина или БАП у линии КМ происходило формирование корней. Однако, через три недели культивирования каллусы и корни дегенерировали. Каллусы линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) на данных средах в течение первых двух недель оставались без изменений, а затем у них наблюдалась витрификация и дегенерация.

На средах MS, дополненных 2,4-Д 2,5 мг/л и БАП в концентрации 1,5 и 2,5 мг/л, также не зафиксировано образование побегов. У линии КМ каллусы

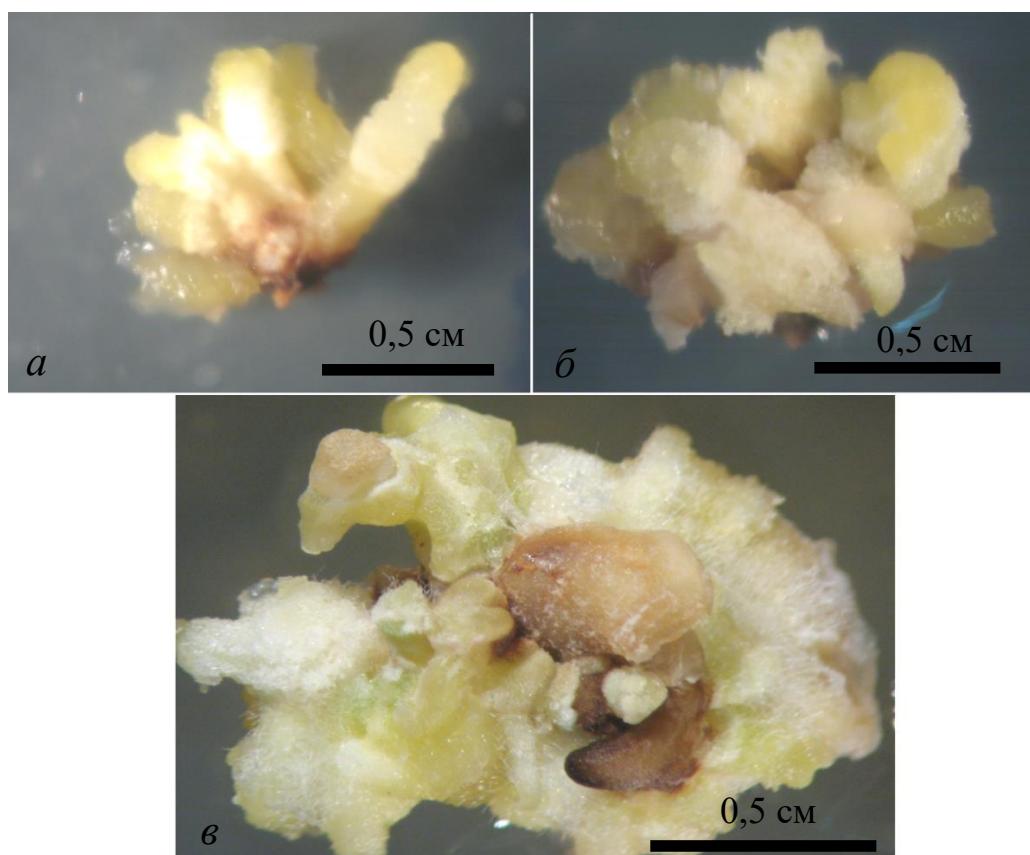
при переносе на данные среды сохраняли свою жизнеспособность, но пролиферации их клеток и образования почек, корней или эмбриоидов не происходило. Каллусы линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*), культивируемые в течение трёх месяцев, формировали корни и стабильно пролиферировали.

На питательных средах MS и N6 с добавлением 6,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК у каллусов линии КМ не наблюдалось каких-либо изменений, тогда как у каллусов линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) через две недели культивирования было зафиксировано формирование корней и эмбриоидоподобных структур (рисунок 7).

Таким образом, полученные данные позволили определить наиболее оптимальные составы питательных сред для индукции каллусогенеза и эмбриоидогенеза. Составы данных сред представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Оптимальные среды для индукции морфогенез

Генотип	Пути морфогенеза		
	Каллусогенез	Эмбриоидогенез	Ризогенез
КМ	MS, дополненная 2 мг/л 2,4-Д	-	MS с 0,5 мг/л кинетина и сахарозой 30 г/л
			MS с 2,0 мг/л кинетина и сахарозой 30 г/л
			MS с 0,5 мг/л БАП и сахарозой 30 г/л
			MS с 2,0 мг/л БАП и сахарозой 30 г/л
АТТМ		MS, дополненная 6,0 мг/л БАП, 2,0 мг/л НУК и сахарозой 60	MS с 1,5 мг/л БАП, 2,5 мг/л 2,4-Д и сахарозой 30 г/л.
		N6, дополненная 6,0 мг/л БАП, 2,0 мг/л НУК и сахарозой 60 мг/л	MS без гормонов и сахарозой 30 г/л



a, б – на среде N6, дополненной 6,0 мг/л БАП, 2,0 мг/л НУК, и сахарозой 60 г/л;
в – на среде MS, дополненной БАП 6,0 мг/л, НУК 2,0 мг/л, и сахарозой 60 г/л

Рисунок 7 – Формирование эмбриоидов на каллусах линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) на средах для регенерации

Выводы:

1. При введении в культуру *in vitro* линий кукурузы КМ и АТТМ (*y, lg, bm, wx*) среди изученных типов первичных эксплантов самыми перспективными оказались зрелые зародыши. Приживаемость их в культуре составила у линии КМ $88,08 \pm 0,2\%$, у линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) $87,5 \pm 0,3\%$. Не выявлено влияния сезонного фактора на успешность инициации стерильных культур.

2. Оптимальной средой для инициации и длительного субкультивирования каллусов у обеих исследованных линий кукурузы оказалась среда MS, дополненная 2 мг/л 2,4-Д. Частота каллусогенеза составила у линии КМ $38,5 \pm 0,5\%$, у линии АТТМ (*y, lg, bm, wx*) $57,1 \pm 0,2\%$. Каллусные

культуры стабильно пролиферировали на протяжении 1,5 лет культивирования при регулярном субкультивировании на среду того же состава через каждые 2–3 месяца.

3. Среди апробированных генотипов наиболее отзывчивой к культивированию *in vitro* оказалась линия АТТМ (*y, lg, bm, wx*), так как именно у этой линии зафиксировали формирование эмбриоидоподобных структур на среде для регенерации. Оптимальными средами для индукции соматического эмбриогенеза были среда MS с 6,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК и среда N6 с аналогичным содержанием фитогормонов.

