

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

Кафедра генетики

**ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА РОСТ И РЕГЕНЕРАЦИЮ
РАСТЕНИЙ БОБОВНИКА АНАГИРОВИДНОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

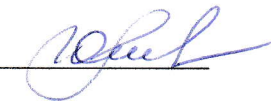
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Емельяновой Ксении Александровны

Научный руководитель:

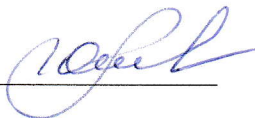
д.б.н., доцент

31.05.23 

О.И. Юдакова

Зав. кафедрой:

д.б.н., доцент

31.05.23 

О.И. Юдакова

Саратов 2023

Введение

Все живые организмы живут и развиваются в присутствии природного электромагнитного (ЭМ) поля. Искусственные ЭМ поля значительно отличаются от природных, что может вызывать различные изменения на клеточном, биохимическом и молекулярном уровнях. В настоящее время остаётся неоднозначным вопрос о влиянии ЭМ полей на растения. Существуют свидетельства как положительного, так и отрицательного воздействия. Такое разнообразие результатов объясняется как особенностями исследуемых биологических объектов, так и различиями в параметрах используемых электромагнитных полей.

В последние годы всё чаще применяется метод предобработки растений электромагнитным полем для улучшения различных показателей, например для повышения всхожести семян. Такой метод кажется перспективным для растений, характеризующихся особым строением семенной кожуры, а именно твердосемянных. Одним из таких растений является *Laburnum anagyroides*.

Целью данного исследования являлось изучение влияния электромагнитной предобработки на прорастание семян и регенерацию *Laburnum anagyroides* в культуре *in vitro*.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) исследовать всхожесть и энергию прорастания интактных и предобработанных семян;
- 2) определить оптимальный режим предобработки семян;
- 3) проанализировать влияние электромагнитной предобработки семян на процессы роста, регенерации и укоренения микропобегов *in vitro*;
- 4) провести гистологическое исследование семенной кожуры и побегов.

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:

Материалом исследования служили семена *L. anagyroides* урожая 2011 и 2016 годов, а также культивируемые *in vitro* проростки и микропобеги.

Электромагнитную предобработку семян осуществляли при помощи генератора сигналов высоких частот Г4-142. Для исследования использовали режимы импульсной и непрерывной генерации с частотой 60 ГГц. Было исследовано 6 вариантов предобработки. Длительность обработки составила 30, 45, 60 и 90 мин. Эксперимент проводили в четырёх повторностях для импульсного и в трех повторностях для непрерывного режима обработки. В каждой повторности исследовано по 15-20 шт. семян. В качестве контроля использовали интактные семена.

Семена обрабатывали стерилизующими растворами и помещали на искусственную питательную среду Мурасиге и Скуга (MS), дополненную 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Культивирование осуществляли в климатокамере при температуре $+24\pm 2^\circ\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде в течение 4 недель. Через месяц первичного культивирования у проростков отсекали корень, а оставшуюся часть переносили на питательную среду MS, дополненную 0,5 мг/л БАП для индукции пазушного ветвления. Для укоренения регенерантов, микропобеги переносили на питательную среду $\frac{1}{4}$ MS, дополненную α -нафтилуксусной кислотой (НУК) в концентрации 0,5 мг/л.

Для выявления гистологических аспектов влияния непрерывной ЭМ предобработки семян на строение семенной кожуры и морфогенез побегов в культуре *in vitro*, экспланты фиксировали ацетоалкоголем (3:1). Семена фиксировали сразу после набухания. Затем готовили микротомные препараты и окрашивали их гематосилином. Для изучения морфогенеза побегов, были приготовлены гистологические препараты с использованием техники просветления растительных тканей.

В контроле энергия прорастания составила в среднем 16,21%. Со второй недели культивирования происходило резкое повышение количества проросших семян, которое достигло максимума на 21 сут (рисунок 1, таблица 1).

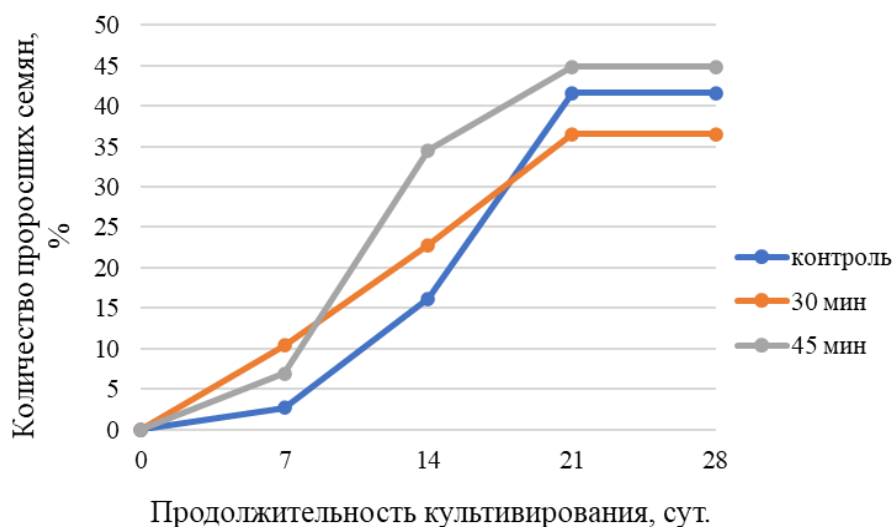


Рисунок 1 – Динамика прорастания семян *L. anagyroides* после импульсной электромагнитной предобработки с частотой 60 ГГц

Таблица 1 – Влияние импульсной электромагнитной предобработки с частотой 60 ГГц на прорастание семян *L. anagyroides* урожая 2016 года

Продолжительность культивирования, сут.	Количество проросших семян в разных вариантах эксперимента, %		
	Контроль	Время ЭМ предобработки, мин	
		30	45
7	2,70	10,42 ^{ns}	6,90 ^{ns}
14	16,21	22,92 ^{ns}	34,48*
21	41,57	36,50 ^{ns}	44,83 ^{ns}
28	41,57	36,50 ^{ns}	44,83 ^{ns}

Примечание – Исследовали четыре повторности по 15 шт. семян в каждом варианте эксперимента; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$; * - показатели статистически достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$.

При 30 мин электромагнитной предобработке семян не выявлено достоверных различий с контролем по показателям «энергия прорастания» и «частота прорастания семян» (рисунок 1, таблица 1). Тогда как, при

предобработке семян ЭМ полем длительностью 45 мин наблюдалось достоверное увеличение энергии их прорастания, однако частота прорастания при данной экспозиции как и в первом варианте не превысила контрольных показателей (рисунок 1, таблица 1).

В эксперименте с непрерывной обработкой, использовались семена 2011 г., которые показали в контроле низкую энергию и частоту прорастания. Они начинали прорастать только после 14 сут., максимальная частота прорастания составила 6,67% (рисунок 2, таблица 2).

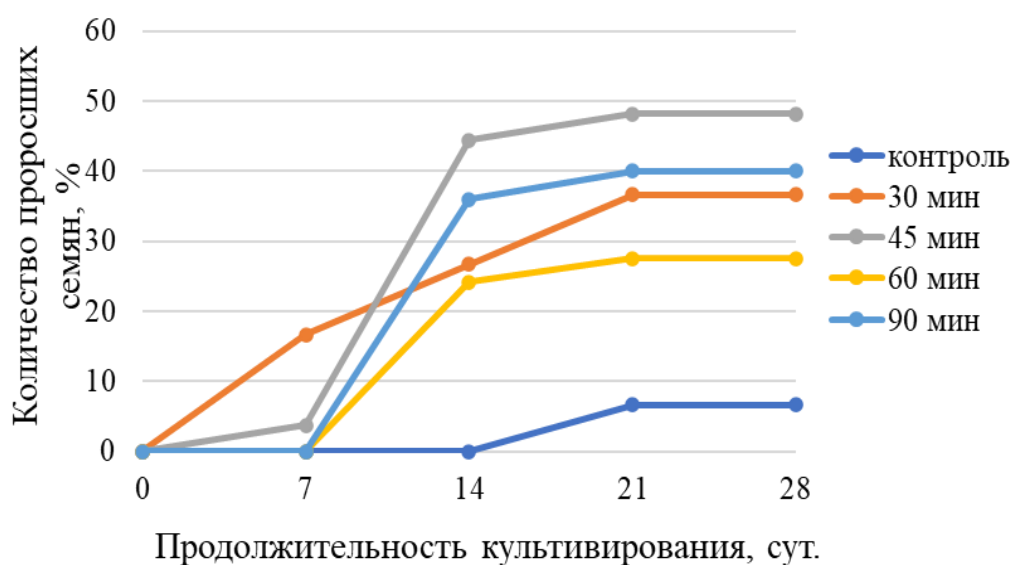


Рисунок 2 – Динамика прорастания семян *L. anagyroides* после непрерывной электромагнитной предобработки с частотой 60 ГГц

После непрерывной ЭМ обработки, в отличие от импульсного режима, во всех вариантах отмечалось достоверное увеличение исследуемых показателей. При 30 мин обработке энергия прорастания достоверно увеличивалась уже на 7 сут. и продолжала расти, постепенно выходя на плато к 21 сут. культивирования. При 45, 60 и 90 мин энергия прорастания достоверно возрастала на 14 сут. культивирования, после чего также выходила на плато на 21 сут. Наиболее эффективными при частоте 60 ГГц оказались экспозиции 45 и 90 мин, но 45 мин обеспечила наибольшее количество проросших семян

(48,15%) и более высокую энергию прорастания. Наименее эффективной оказалась предобработка длительностью 60 мин. (рисунок 2, таблица 2).

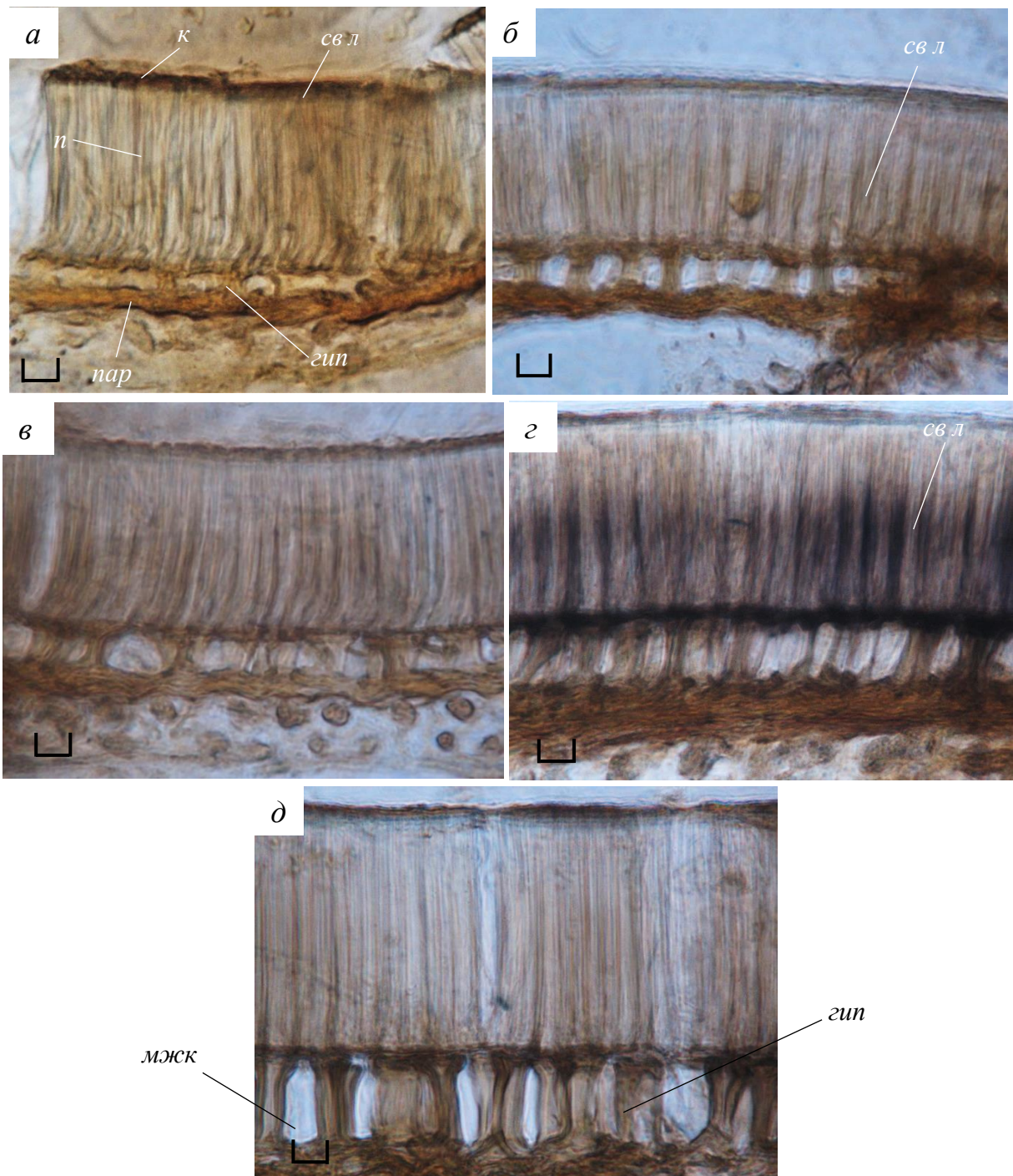
Таблица 2 – Влияние непрерывной электромагнитной предобработки с частотой 60 ГГц на прорастание семян *L. anagyroides* урожая 2011 года

Продолжительность культивирования, сут.	Количество проросших семян в разных вариантах эксперимента, %				
	Контроль	Время ЭМ предобработки, мин			
		30	45	60	90
7	0,00	16,66*	3,70 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
14	0,00	26,67**	44,44***	24,14*	36,00**
21	6,67	36,67*	48,15**	27,59*	40,00**
28	6,67	36,67*	48,15**	27,59*	40,00**

Примечание – Исследовали 3 повторности по 15 шт. семян в каждом варианте эксперимента; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$; * - показатели статистически достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$; ** - показатели статистически достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,01$ *** – показатели статистически достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,001$.

В ходе гистологического исследования внешних покровов семян, предобработанных непрерывным ЭМ излучением, были выявлены значительные изменения в ее структуре по сравнению с контролем (рисунок 3).

Кутикула в контроле имеет большую толщину, чем после предобработки. В клетках палисадного слоя после электромагнитной предобработки, клетки расширяются, межклеточное расстояние повышается. Наибольшие изменения отмечены при воздействии 90 мин обработки. Значительные изменения происходят в гиподерме. Во всех вариантах с предобработкой клетки вытягивались, становились менее сжатыми, пространство между ними увеличивалось. Наиболее сильное изменение обнаружено после 90 мин (рисунок 3, д) предобработки. Ещё одним слоем, где происходили изменения после воздействия ЭМ поля, является паренхима. В опытных вариантах по сравнению с контролем, паренхима становилась более рыхлой. Особенно это заметно на срезах кожуры после 60 и 90 мин предобработки (рисунок 3, з, д).



a – контроль, *б* – после 30 мин предобработки, *в* – после 45 мин предобработки, *г* – после 60 мин предобработки, *д* – после 90 мин предобработки (*к* – кутикула, *св л* – световая линия, *п* – палисадный слой, *гип* – гиподерма, *мжк* – межклетники, *пар* – паренхима). Масштаб: 10 нм

Рисунок 5 – Поперечный срез кожуры семени *L. anagyroides*

Проростки, развившиеся в контроле и после предобработки морфологически не различались между собой. Аномалий развития не выявлено.

Обработка семян непрерывным электромагнитным полем с частотой 60 ГГц не оказывает достоверного влияния на морфометрические показатели развившихся проростков (таблица 3). Можно предположить, что из-за особенностей выбранной частоты, которая оказывает влияние только на наружные ткани, а также строения кожуры семян *L. anagyroides*, электромагнитное излучение не оказывает повреждающего, либо стимулирующего действия на зародыш.

Таблица 3 – Влияние электромагнитной предобработки семян *L. anagyroides* на морфометрические показатели развившихся проростков

Время ЭМ предобработки, мин	Средняя длина проростков, мм	Морфометрические показатели проростков, мм		
		корень	гипокотиль	эпикотиль
0 (контроль)	39,5±1,5	13,5±3,5	19,0±1,0	7,0±3,0
30	53,0±4,4	13,0±1,9	32,0±1,3	10,1±2,0
45	44,1±3,4	13,0±1,5	26,4±2,6	10,2±1,9
60	48,1±5,7	13,1±2,2	28,7±3,0	10,0±2,3
90	45,8±2,8	14,0±1,1	28,5±1,8	8,2±1,1
F	0,89 ^{ns}	0,07 ^{ns}	1,67 ^{ns}	0,30 ^{ns}

Примечание – Учитывались длины эпикотилей больше 3 мм; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$.

В процессе культивирования на среде для микроразмножения у всех эксплантов отмечался рост главного побега и листьев. В зоне среза происходило разрастание базальной части побега. Под действием цитокинов, активировались пазушные меристемы, что приводило к формированию боковых побегов. Через 8 недель культивирования, как в контроле, так и в опытных вариантах развивались нормальные микропобеги.

Электромагнитная предобработка семян непрерывным ЭМ полем не оказывала достоверного влияния на последующую регенерацию в культуре. Количество развившихся микропобегов и их длина в опытных вариантах не отличалась от контроля (таблица 4).

Таблица 4 – Регенерация микропобегов *L. anagyroides* в контроле и после ЭМ предобработки на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП

Время ЭМ предобработки, мин	Количество развившихся микропобегов, шт.	Средняя длина микропобегов, мм	
		главный	пазушные
0 (контроль)	2,5±0,5	20,0±5,0	10,5±1,6
30	3,0±0,4	30,3±2,4	13,3±1,1
45	2,5±0,5	29,8±4,7	14,9±1,5
60	3,2±0,5	18,5±2,2	12,3±1,3
90	2,4±0,4	33,3±2,3	12,8±1,2
F	0,6 ^{ns}	2,9 ^{ns}	0,6 ^{ns}

Примечание – Исследовали 2 повторности по 10 шт. в каждом варианте эксперимента; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$.

Побеги длиной больше 10 мм отделяли и снова переносили на среду для размножения. Показатели вновь развившихся микропобегов при дальнейшем культивировании оказались сопоставимы с результатами 1 пассажа и статистически не различались между собой (таблица 5).

Таблица 5 – Регенерация микропобегов *L. anagyroides* на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП

Время ЭМ предобработки, мин	Количество развившихся микропобегов, шт.	Средняя длина микропобегов, мм	
		главный	пазушные
0 (контроль)	2,1±0,3	26,5±3,2	13,5±1,1
30	2,6±0,4	19,4±2,4	11,5±1,6
45	2,3±0,4	25,3±3,3	15,2±1,4
60	2,1±0,3	28,0±2,6	12,9±1,8
90	1,9±0,2	25,6±1,9	10,7±1,0
F	0,9 ^{ns}	1,1 ^{ns}	1,8 ^{ns}

Примечание – Исследовали 2 повторности по 15 шт. в каждом варианте эксперимента; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$.

Для индукции корнеобразования, регенеранты полученные на этапе собственно размножения, переносили на среду с ауксинами. Формирование корней из зоны основания микропобега начиналось в среднем через 2 недели их нахождения на среде. Через 4-6 недель культивирования регенеранты имели сформированную корневую систему. По результатам однофакторного дисперсионного анализа, различия по количеству укоренившихся микропобегов и среднему количеству образовавшихся на одном экспланте корней, между контролем и опытными вариантами отсутствуют (таблица 6).

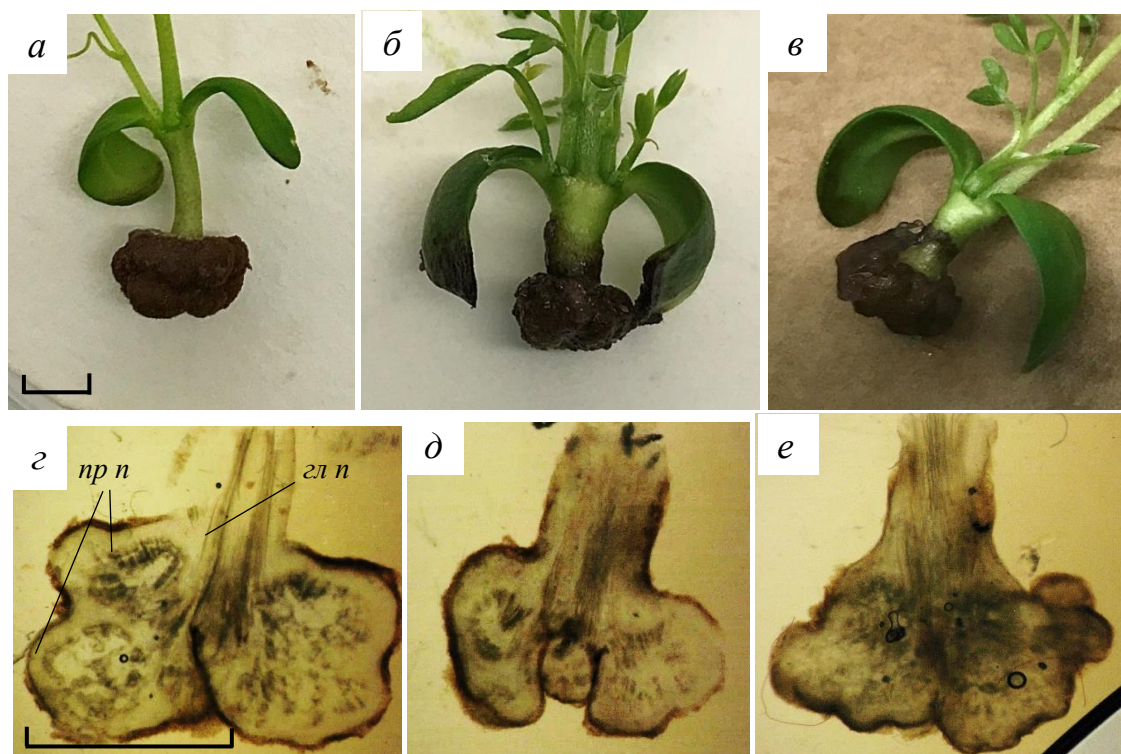
Таблица 6 – Укоренение микропобегов *L. anagyroides* на среде ¼ MS, дополненной НУК 0,5 мг/л

Время ЭМ предобработки, мин	Количество укоренившихся, %	Среднее количество корней, шт.
0 (контроль)	30,00	5,33±0,9
30	20,00	2,5±1,5
45	30,00	3,33±0,7
60	33,33	5,00±1,2
90	18,18	3,00±1,0
F	0,47 ^{ns}	1,20 ^{ns}

Примечание – Исследовали 2 повторности по 5 эксплантов в каждом варианте эксперимента; ns – отсутствуют статистически достоверные различия с контролем при $p > 0,05$.

Для того, чтобы определить оказывает ли влияние ЭМ предобработка семян непрерывным излучением на последующий морфогенез побегов в культуре *in vitro*, проводили гистологический анализ. При культивировании побегов на среде с БАП 0,5 мг/л во всех вариантах происходило разрастание базальной части побега. Анализ продольных срезов эксплантов, культивируемых в течение 8 недель, показал, что как в контроле, так и в опытных вариантах проводящие ткани главного побега были объединены с проводящими пучками его разросшейся базальной части. Во всех вариантах эксперимента наблюдалось формирование глобулярных структур. Они представляют собой очаги повышенной пролиферативной активности, которые, впоследствии, дадут

начало адвентивным побегам. По результатам проведённого гистологического исследования базальной части побегов, можно сделать вывод, что электромагнитная предобработка не оказывает влияния на процессы морфогенеза (рисунок 4).



a, z – контроль, *б, д* – после 30 мин обработки, *в, е* – после 90 мин обработки
(*глп* – главный побег, *прп* – проводящие пучки). Масштаб: 1 см

Рисунок 4 – Продольные срезы через базальную часть побегов
L. anagyroides через 8 недель культивирования

Выводы:

1. Электромагнитная предобработка семян *L. anagyroides* импульсным излучением с частотой 60 ГГц в течение 45 мин повышает энергию прорастания на 18,27% по сравнению с контролем и не влияет на всхожесть.

2. Электромагнитная предобработка семян непрерывным излучением частотой 60 ГГц с экспозицией 30, 45, 60 и 90 мин вызывает значительное повышение энергии их прорастания и всхожести (с 6,67% в контроле до 48,15% в эксперименте). Наиболее эффективной является предобработка длительностью 45 мин.

3. Гистологический анализ показал, что при предобработке семян *L. anagyroides* непрерывным ЭМ излучением частотой 60 ГГц происходят следующие изменения в структуре семенной кожуры: расширение клеток палисадного слоя, увеличение размера клеток гиподермы; разрыхление паренхимы. Это может быть следствием повышения проницаемости внешних покровов семян.

4. Электромагнитная предобработка семян непрерывным ЭМ полем с частотой 60 ГГц не имеет пролонгированного эффекта. Она оказывает влияние только на прорастание семян и не влияет на морфометрические показатели развившихся из них проростков, а также последующие процессы морфогенеза и регенерации побегов в культуре *in vitro*.

5. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности работ по исследованию и поиску оптимальных режимов предобработки семян для преодоления физического покоя.

