

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

Кафедра генетики

**РЕАКЦИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ ПАСЛЁНОВЫХ НА УСЛОВИЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO***

Автореферат бакалаврской работы
студентки 4 курса 422 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
биологического факультета
Линковой Любови Игоревны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

7.06.23 
дата, подпись

Т.А. Алаторцева

Зав. кафедрой:

док. биол. наук

7.06.23 
дата, подпись

О.И. Юдакова

Саратов 2023

Введение:

Культура *in vitro* – перспективный способ воспроизводства растений, размножение которых сопряжено с определенными трудностями или по ряду причин в естественных условиях невозможно. В настоящее время метод успешно применяется в отношении представителей разных семейств растений. Это касается и паслёновых, обладающих важными для человека пищевыми, лекарственными и декоративными свойствами. Растения семейства Solanaceae давно зарекомендовали себя и как объекты генно-инженерных работ.

На рынке имеется много востребованных гетерозисных гибридов, сохраняющих свои уникальные качества только в первом поколении при семенном размножении, чем объясняется их высокая коммерческая стоимость. Использование метода *in vitro* позволяет ускорить процесс массового воспроизводства таких растений, сохранить их ценные свойства и снизить стоимость посадочного материала.

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. Цель настоящей работы:

Цель настоящей работы:

Определить перспективы использования двух типов эксплантов для получения растений-регенерантов паслёновых в культуре *in vitro*.

В задачи работы входило:

1. Определить спектр и интенсивность морфогенеза при эксплантации листовых фрагментов разных видов паслёновых.
2. Оценить индуцирующий эффект вариантов питательных сред для регенерации растений.
3. Выявить донорные формы растений, перспективные для культивирования и получения регенерантов *in vitro*.
4. Определить особенность морфогенетических процессов в культуре неопылённых завязей.

5. Изучить возможность получения гаплоидных растений у исследуемых форм в культуре неопылённых завязей.

Структура и объем работы:

Выпускная квалификационная работа состоит из обозначений и сокращений, 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:

Объектами исследования являлись 10 видов паслёновых. Растения для получения эксплантов выращивали либо в условиях открытого грунта (баклажан, дурман, паслён, перец, томат, физалис), либо в горшечной культуре в оранжерее (калибрахоа, петуния, петхоа, табак). Со здоровых растений срезали молодые листья и цветки в период раскрытия бутонов.

Из простерилизованных листьев и цветочных бутонов получали, соответственно, листовые фрагменты и завязи (удалив с них покровы). Все экспланты помещали в пробирки с 7 мл питательной среды.

Питательные среды включали минеральные компоненты по Мурасиге и Скугу и различные сочетания концентраций ауксина ИУК и цитокинина 6-БАП.

При культивировании листовых эксплантов были протестированы 6 вариантов с сахарозой 20 г/л:

№ 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;

№ 4 – ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л;

№ 5 – ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л;

№ 6 – ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 4,0 мг/л.

Для завязей табака питательная среда была представлена в трёх вариантах с сахарозой 10 г/л.

№ 1 – ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л;

№ 2 – ИУК – 0,5 мг/л; БАП – 1,0 мг/л;

№ 3 – ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 0,5 мг/л.

Для завязей баклажана питательная среда была представлена в двух вариантах с сахарозой 20 г/л.

№ 1 – макросоли MS $\frac{1}{2}$ концентрации; ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л.

№ 2 – макросоли MS 100% концентрации; ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л.

В ходе эксперимента было установлено, что спектр морфогенетических процессов у эксплантов разных видов паслёновых в целом идентичен, и может включать: неморфогенный и морфогенный каллусогенез, а также прямой геммогенез и непрямой геммогенез, опосредованный через каллус.

Неморфогенный каллус формируется, как показано на рисунке 1, из раневого каллуса по краю среза листового экспланта или в области травмирования поверхности листа.

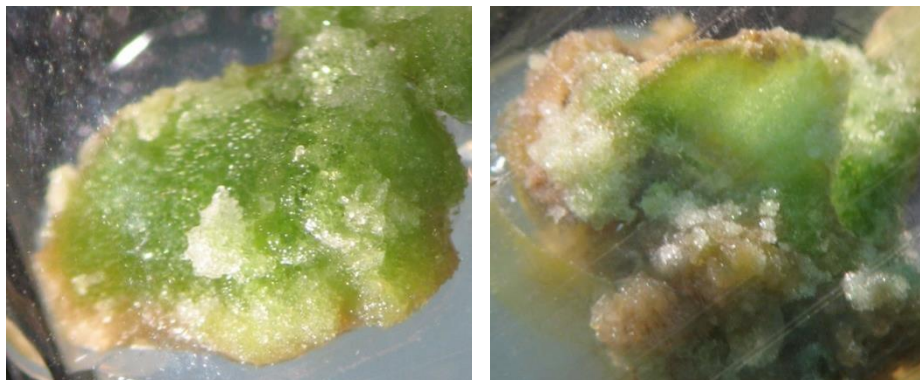


Рисунок 1 – Формирование неморфогенного каллуса в культуре листовых эксплантов дурмана

Морфогенный каллус появляется, как это видно на рисунке 2, в области среза листовых фрагментов или на визуально неповрежденной поверхности экспланта. Развитие каллуса начинается с образования глобулярных структур, количество которых со временем увеличивается. Со временем каллус, представленный плотной массой глобул, увеличиваясь в объёме, может заполнить значительный объём пробирки. В исходном пассаже глобулы, составляющие каллус, трансформируются в вегетативные почки. В результате

чего такой каллус становится источником развития большого количества растений-регенерантов.



Рисунок 2 – Образование морфогенного глобулярного каллуса и трансформация глобул в вегетативные почки на фрагментах листьев петунии

Такой путь образования почек и далее растений через каллусогенез получивший название непрямой геммогенез, представлен на рисунке 3.

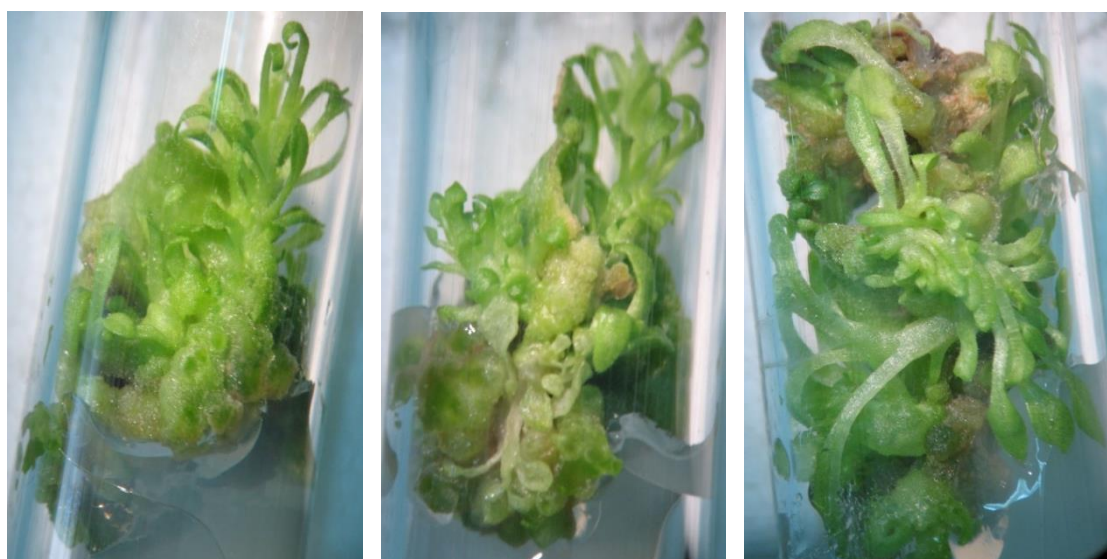


Рисунок 3 – Развитие растений-регенерантов петунии *in vitro* путём непрямого геммогенеза

Прямой геммогенез – образование почек на поверхности листовых дисков или по краю среза, минуя каллусогенез, как видно из рисунка 4. В этом случае

из эпидермальных и субэпидермальных клеток ткани листа появляются сначала бугристые или шаровидные ворсистые структуры, трансформирующиеся в вегетативные почки, а затем в растения.

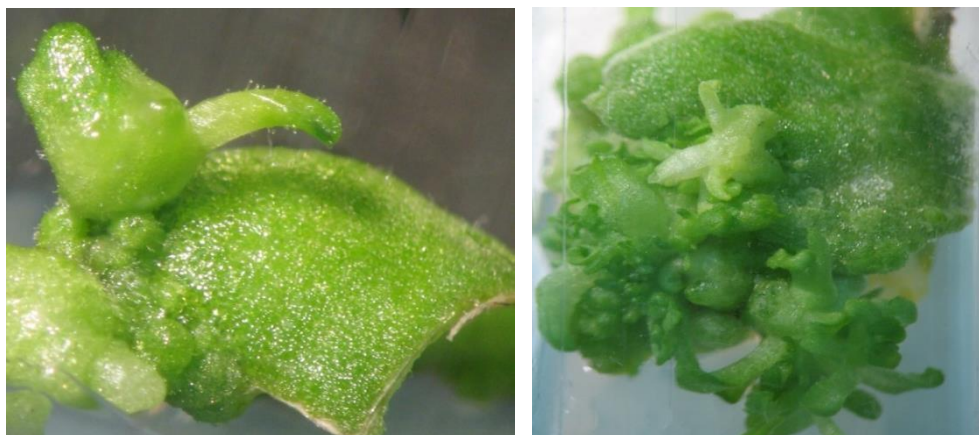


Рисунок 4 – Прямой геммогенез при культивировании листовых фрагментов петунии

Геммогенез как прямой, так и непрямой, мог привести к одновременному развитию большого количества регенерантов.

Однако вместо морфогенетических изменений можно было наблюдать и дегенеративные процессы, как показано на рисунке 5. В этих случаях экспланты продолжительное время остаются в неизменном виде, затем либо высыхают, либо на их поверхности формируется неморфогенный каллус, который далее некротизирует.



Рисунок 5 – Начальные стадии некротических явлений в культуре листовых эксплантов дурмана

Было замечено, что интенсивность формирования новообразований на эксплантах варьировала в зависимости от генотипа донора и гормонального состава среды.

Так, у эксплантов баклажана, калибрахоа, перц и физалиса, ни на одном из испытанных вариантов среды не отмечалось тенденций к морфогенетическим преобразованиям. Как видно из таблицы 1, только культивирование петхоа, петунии и дурмана оказалось более успешным. Именно, для них был характерен названный спектр морфогенетических процессов.

Таблица 1 – Морфогенез в культуре листовых эксплантов паслёновых

Генотип донорных растений	Питательная среда		Частота проявления морфогенеза, %		
	№ варианта	фитогормоны, мг/л	Неморфогенный каллусогенез	морфогенный каллусогенез	прямой геммогенез
Баклажан <i>Solanum melongena</i> , гибрид Король рынка F ₁	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	0	0	0
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	0	0	0
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	0	0	0
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	0	0	0
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	0	0	0
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	0	0	0
Дурман <i>Datura metel</i>	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	6,3	31,3	9,4
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	5,9	32,4	14,7
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	8,8	47,1	11,8
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	6,1	63,6	24,2
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	6,3	43,8	9,4
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	3,2	3,2	9,7
Калибрахоа <i>Calibrachoa</i> , сорт Aloha Double Orange	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	0	0	0
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	0	0	0
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	0	0	0
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	0	0	0
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	0	0	0
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	0	0	0
Перец <i>Сápsicum ánnum</i> , гибрид Мегатон красный F ₁	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	0	0	0
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	0	0	0
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	0	0	0
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	0	0	0
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	0	0	0
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	0	0	0
<i>Petunia hybrida</i> , сорт Blanket Violet	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	2,9	38,2	41,2
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	3,0	42,4	42,4
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	6,3	65,6	62,5
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	3,0	51,5	57,6
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	6,3	34,4	37,5
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	5,9	35,3	52,9
Петхоа, <i>Petchoa</i> ,	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	15,2	0	0
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	9,4	3,1	0

Продолжение таблицы 1

сорт Beautical Cinnamon	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	6,5	12,9	0
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	3,4	10,3	6,9
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	3,2	0	0
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	6,3	6,3	3,1
Физалис <i>Physalis pubescens</i> (сорт Сюрприз)	1	ИУК – 0,5; БАП – 0,5	0	0	0
	2	ИУК – 0,5; БАП – 1,0	0	0	0
	3	ИУК – 1,0; БАП – 1,0	0	0	0
	4	ИУК – 1,0; БАП – 2,0	0	0	0
	5	ИУК – 2,0; БАП – 1,0	0	0	0
	6	ИУК – 2,0; БАП – 4,0	0	0	0

Дурман *Datura metel.* Наблюдение за развитием листовых эксплантов дурмана показало, что частота неморфогенного каллусогенеза может варьировать в зависимости от состава питательной среды от 3,2% на среде №6 с ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 4,0 мг/л и до 8,8% на среде №3 с ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л. Статистически достоверных различий при этом между средами не отмечается, хотя визуально отмечается некоторая бóльшая тенденция среды №3 к индукции неморфогенного каллуса. Что касается морфогенного каллуса то, наибольшее индуцирующее действие оказывали среды №4 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л). Прямой геммогенез имел место у дурмана на всех испытанных средах, однако из всех шести вариантов максимальная частота образования почек непосредственно из тканей листовой пластинки, была установлена на среде №4 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л).

Петуния Blanket Violet. Культивирование эксплатов этого вида показало, что неморфогенный каллусогенез может быть индуцирован в равной степени на всех вариантах питательной среды при варьировании частоты от 2,9 % на среде №1 до 6,3% на средах №3 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л) и №5 (ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л). У этого же объекта морфогенный каллусогенез, был также индуцирован на всех средах, но с максимальной частотой на среде №3, включающей ИУК и БАП в количестве по 1,0 мг/л. Непосредственное развитие почек на листовых дисках (прямой геммогенез) наблюдали у петунии также на всех средах, но с максимальными частотами: 62,5%, 57,6%, 52,9%, на средах, соответственно, №3 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л, №4 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП

– 2,0 мг/л), №6 (ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 4,0 мг/л), то есть с содержанием ауксина и цитокинина либо в равном количестве, либо в соотношении 1:2.

Петхоа Beautical Cinnamon. Индукция морфогенетических преобразования происходит с меньшей интенсивностью. Так, неморфогенный каллус мог появиться при помещении эксплантов на все наши варианты питательной среды. Однако максимальная частота его образования оставила 15,2% на среде №1 (ИУК – 0,5 мг/л; БАП – 0,5 мг/л) и минимальная на среде №5 (ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л). Более перспективный для получения регенерантов, морфогенный каллус был индуцирован у этого гибрида на средах №2, №3, №4 и №6 с минимальной частотой 3,1% на среде №2 (ИУК – 0,5 мг/л; БАП – 1,0 мг/л) и максимальной – 12,9% на среде №3 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л). Прямой путь образования растений-регенерантов из почек – геммогенез, встречался только на средах №4 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л) с частотой 6,9% и №6 (ИУК – 2,0 мг/л; БАП – 4,0 мг/л) с частотой 3,1%.

Из проведённого эксперимента следует, что названные представители семейства паслёновых обладают в данных условиях *in vitro* разным морфогенетическим потенциалом, который в большей степени определяется генотипическими особенностями донора и в меньшей степени составом питательной среды.

Наблюдение за эксплантированными завязями и анализ результатов культивирования показали, что завязи четырёх донорных форм: дурмана индийского *Datura metel* L.; паслёна чёрного *Solanum nigrum* L.; перца *Сápsicum áppium* L. (гибрид Мегатон красный F₁); томата *Solánum lycopérsicum* L. (гибрид Марьяна роцца F₁). на обоих вариантах питательной среды проявляли тенденцию лишь к образованию неморфогенного каллуса, неперспективного для получения растений-регенерантов. Только завязи баклажана *Solánum melongéna* L. (гибрид Король рынка F₁) и табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Вирджиния 202) иначе реагировали на условия культивирования. От соматических тканей их завязей формировался морфогенный каллус, дающий начало вегетативным почкам, что видно на рисунке б.



Рисунок 6 – Соматический геммогенез *in vitro* в культуре завязей табака

Вызвать же пролиферативные процессы в семязачатках и, соответственно, получить гаплоидные растения из клеток зародышевых мешков в данных условиях не удалось. Было отмечено несинхронное увеличение размеров семязачатков, как видно на рисунках 7 и 8.

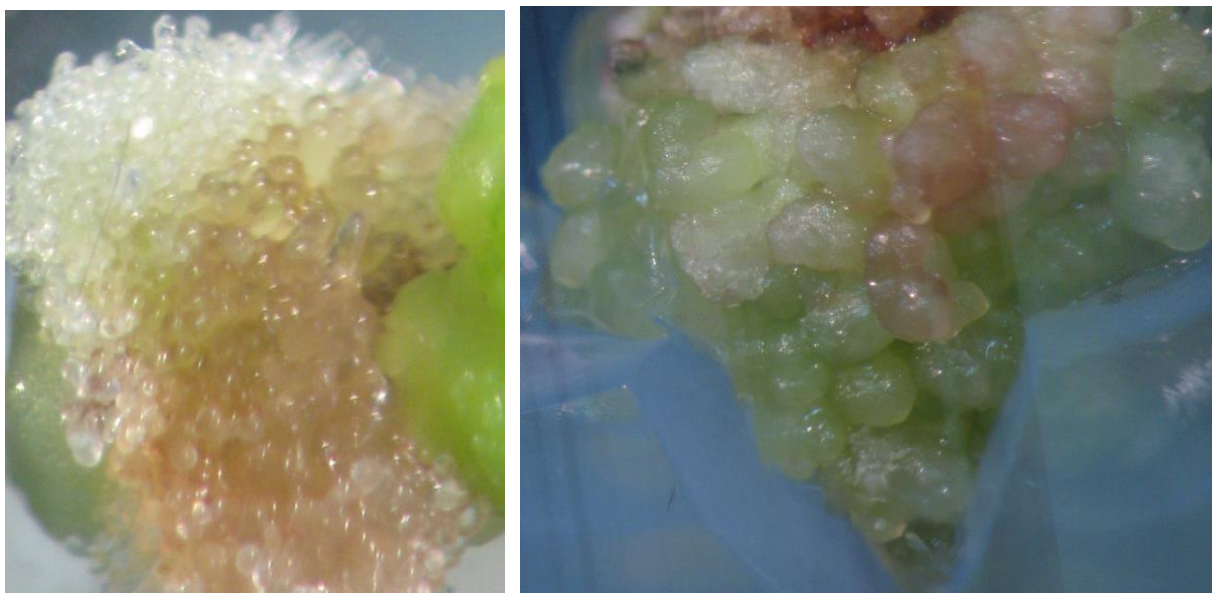


Рисунок 7 – Семязачатки табака в культуре неопылённых завязей

На гистологических срезах, представленных на рисунке 8, можно увидеть семязачатки разных размеров с неровными поверхностями, а также их

«почкование», проявляющееся в появлении дочерних семяпочкоподобных глобулярных структур на поверхности исходных семязачатков.



Рисунок 8 – Срез завязей баклажана, культивируемых *in vitro*

Исходя из полученных результатов можно предположить, что неоднозначная реакция эксплантов на условия культивирования объясняется неадекватностью состава питательной среды для данных генотипических форм.

Выводы:

1. При положительной реакции листовых эксплантов на условия культивирования отмечаются следующие типы морфогенеза: морфогенный и неморфогенез каллусогенез, а также прямой геммогенез и непрямой геммогенез (опосредованный через каллус).
2. Интенсивность морфогенетических процессов варьирует в зависимости гормонального состава среды и видовой принадлежности донора экспланта.
3. Положительная реакция на условия культивирования установлена только у листовых эксплантов трёх из семи исследуемых видов: Дурмана индийского *Datura metel* L., Петунии гибридной *Petunia hybrida* L. (сорт Blanket Violet) и петхоа *Petchoa hybrid* G. Voker & J.M.H. (сорт Beautical Cinnamon), которые могут быть использованы для получения растений - регенерантов. Экспланты баклажана *Solanum melongéna* L. (гибрид Король рынка F₁), калибрахоа *Calibrachoa* Cerv. (сорт Aloha Double Orange), Перца сладкого *Cápsicum ánnuum* L. (гибрид Мегатон красный F₁) и Физалиса

земляничного *Physalis pubescens* L. (сорт Сюрприз) некротизировали в процессе культивирования и оказались неперспективными для развития в данных условиях.

4. Наибольшим индуцирующим действием для развития регенерантов на листовых эксплантах путём прямого и непрямого геммогенза обладают варианты питательной среды №3 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 1,0 мг/л) и №4 (ИУК – 1,0 мг/л; БАП – 2,0 мг/л).
5. Из возможных морфогенетических процессов, происходящих в культуре неопылённых завязей был отмечен только у баклажана *Solanum melongena* L. (гибрид Король рынка F₁) и табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Вирджиния 202) не прямой соматический геммогенез, приводящий к развитию вегетативных почек.
6. Тенденции к развитию гаплоидных регенерантов при культивировании неопылённых завязей всех исследуемых видов растений не установлено.

