

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

Кафедра генетики

**КУЛЬТУРА ЗАВЯЗЕЙ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ
ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 422 группы

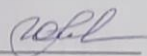
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Фадеевой Натальи Олеговны

Научный руководитель:

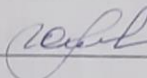
д.б.н., доцент

6.06.23 

О.И. Юдакова

Зав. кафедрой:

д.б.н., доцент

6.06.23 

О.И. Юдакова

Саратов 2023

Введение

Кукуруза (*Zea mays* L.) — это важная продовольственная, кормовая и техническая культура. Генотип кукурузы демонстрирует огромную генетическую изменчивость, которая способствует выживанию растения в тропических, субтропических и умеренных условиях. Актуальным является выведение новых высокопродуктивных и экологически пластичных сортов или линий для выращивания в умеренных широтах, так как их генетическое разнообразие ограничено. В настоящее время для кукурузы разработаны различные методы получения гаплоидов, такие как культура *in vitro* пыльников и неоплодотворенных завязей, индукция матроклинной гаплоидии опылением пыльцой растений линий-гаплоиндукторов. Однако эффективность этих методов остается невысокой. Одним из способов повысить эффективность использования гаплоидов в селекции может стать использование методов клонального микроразмножения гаплоидных растений. Для генетиков и селекционеров представляют большой интерес особенности партеногенетического развития, так как они используются для получения гомозиготных линий, закрепления гетерозиса, гаплоидов, поддержания ценных для хозяйственных нужд мутантных форм.

Целью данной работы было изучение особенностей введения в культуру *in vitro* завязей гаплоидных растений кукурузы.

Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

1. Среди выращиваемых на экспериментальном поле растений партеногенетических линий кукурузы отобрать гаплоидные экземпляры для дальнейшего использования их в качестве доноров эксплантов.

2. Ввести в культуру *in vitro* зрелые завязи гаплоидных растений кукурузы.

3. Изучить влияние индукторов морфогенеза на рост и развитие изолированных завязей в культуре *in vitro*.

4. Провести гистологический анализ развивающихся в культуре *in vitro*

завязей гаплоидных растений кукурузы.

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:

В качестве материала исследования использовали гаплоидные растения партеногенетической линии кукурузы АТТМ. Данная линия характеризуется наследуемым типом гаплоидии. Семена линии АТТМ без предварительного анализа высаживали в открытый грунт на экспериментальных полях ФГНУ «Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы» (Саратов). На репродуктивной стадии развития, до появления рылец у женских соцветий среди высаженных экземпляров проводили отбор гаплоидных растений по морфологическим признакам (низкий рост, отсутствие или полная стерильность мужских соцветий). Початки гаплоидных растений изолировали пергаментными пакетами, и затем после появления рылец початки собирали. В день сбора початков выделяли из них завязи, стерилизовали и пассировали на среду для инициации стерильной культуры. Таким образом, первичным эксплантом служили неопыленные зрелые завязи гаплоидных растений (рис. 1).



Рисунок 1 – Початок и завязи кукурузы при введении в культуру *in vitro*

Исследуемый материал обрабатывали стерилизующими растворами в стерильных условиях ламинар-бокса и переносили на искусственную питательную среду Мурасиге-Скуга со стандартным (MS-N) и с увеличенным в два раза (MS-2N) содержанием минеральных компонентов, дополненных сахарозой и фитогормонами в различной концентрации. Для проведения гистологического анализа материала при помощи микротомы готовили постоянные препараты, окрашенные гематоксилином.

Проведенный анализ показал, что приживаемость изолированных зрелых завязей гаплоидных растений кукурузы на апробированных питательных средах варьировала от 0 до 100% (таблица 1). Использование в качестве индуктора морфогенеза ауксиноподобного гормона 2,4-Д приводило к дегенерации эксплантов. Завязи постепенно приобретали коричневую окраску и через 1 мес. от начала культивирования полностью дегенерировали (рисунок 2).

Таблица 1 – Частота приживаемости завязей кукурузы линии АТТМ на искусственных питательных средах разного состава

Длительность культивирования, мес.	Количество прижившихся завязей на питательной среде, %				
	MS-N*			MS-2N	
	2 мг/л 2,4-Д, 100 г/л сахарозы	0,5 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы	2,0 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы	0,5 мг/л БАП, 50 г/л сахарозы	2,0 мг/л БАП, 50 г/л сахарозы
1	0	100	90	0	100
	0	90	95	0	100
	0	100	0	0	0
Среднее	0	96,7	61,7	0	66,7
2	0	100	90	0	100
	0	85	90	0	100
	0	100	0	0	0
Среднее	0	95,0	60,0	0	66,7
7	0	100	90	0	100
	-	70	-	0	-
	-	-	0	-	-
Среднее	0	58,3	60	0	33,3

Примечание: Было изучено три повторы по 10 завязей в каждой; MS-N - среда Мурасиге-Скуга со стандартным содержанием минеральных компонентов; MS-2N - среда

Мурасиге-Скуга с увеличенным в два раза содержанием минеральных компонентов. В строках, обозначенных «-» не учитывали, так как материал был зафиксирован.

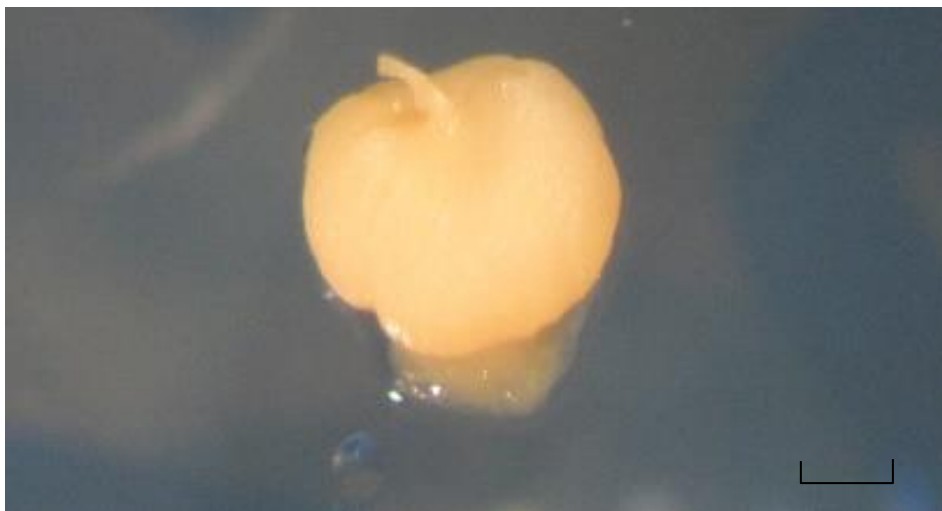


Рисунок 2 – Неопыленные завязи кукурузы через 1 месяц культивирования на среде MS-N с 2 мг/л 2,4-Д. Масштаб: 1 мм

Неоднозначные результаты показало использование в качестве индукторов морфогенеза цитокинина БАП. При добавлении в среду БАП в концентрации 2,0 мг/л завязи приживались практически с одинаковой частотой независимо от содержания в среде минеральных компонентов и концентрации сахарозы (таблица 1, рисунок 3). В то же время приживаемость эксплантов на среде с 0,5 мг/л БАП зависела от содержания сахарозы и минеральных компонентов. На среде MS с удвоенным содержанием минеральных компонентов и 50 г/л сахарозы завязи не приживались и постепенно дегенерировали, а на среде MS стандартного минерального состава с добавлением 30 г/л сахарозы через 1 месяц культивирования приживаемость эксплантов составила 96,7%.

Через 2 месяца от начала культивирования на средах MS-N, дополненных БАП, частота приживаемости незначительно снизилась за счет дегенерации единичных завязей (рисунок 3, 4): с 96,7 до 95,0% на среде с 0,5 мг/л БАП и с 61,7 до 60,0% на среде с 2,0 мг/л БАП. На среде MS с удвоенным содержанием

минеральных веществ (MS-2N), дополненной 2,0 мг/л БАП, жизнеспособность сохранили все завязи (рисунок 3).

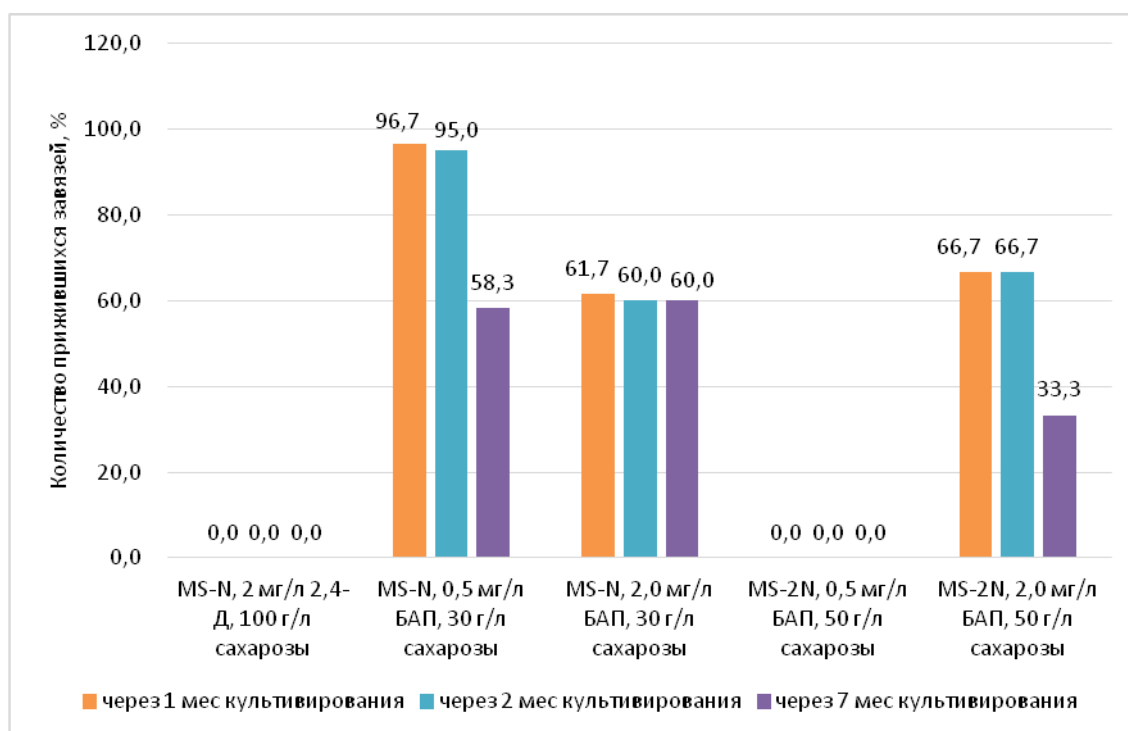


Рисунок 3 – Частота приживаемости эксплантов на средах разного состава

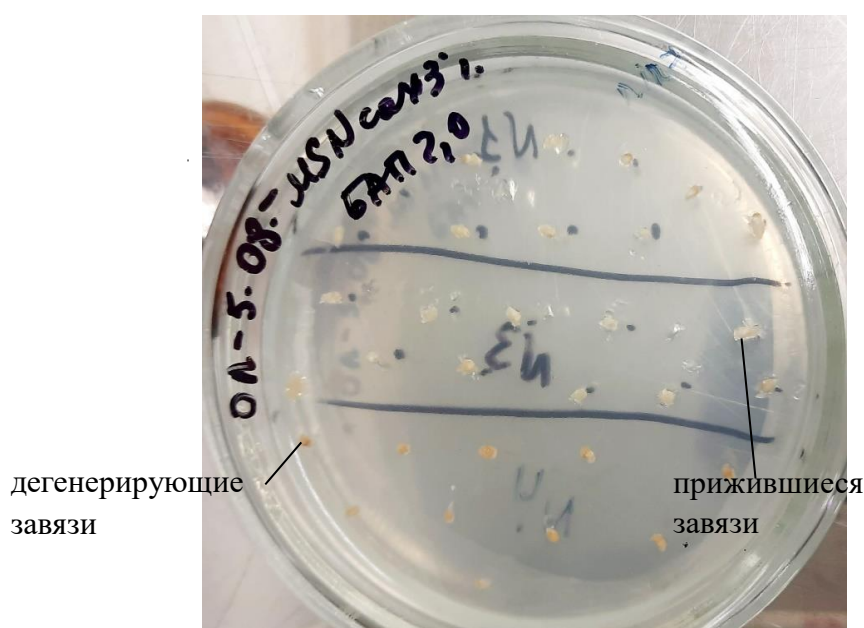
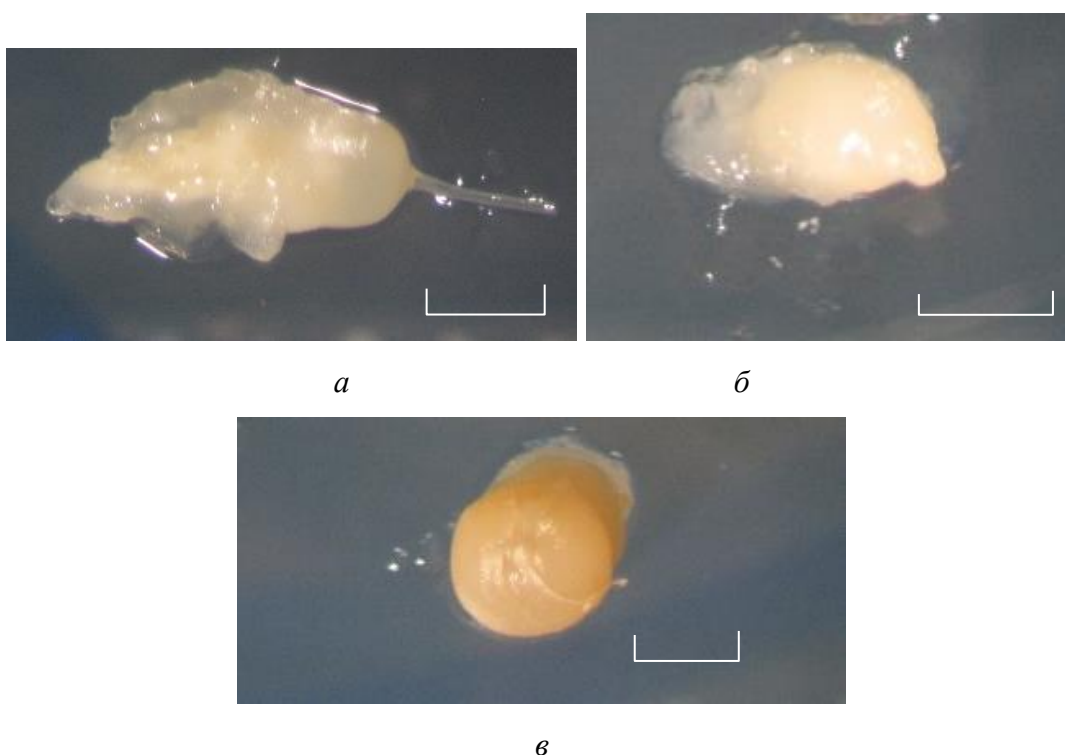


Рисунок 4 – Неопыленные завязи кукурузы через 2 месяца культивирования на среде MS-N, дополненной 2,0 мг/л БАП

Анализ эксплантов через 7 месяцев от начала культивирования, показал, что, несмотря на длительное культивирование у завязей отсутствовали признаки дегенерации, но в то же время не наблюдалось их увеличения в размерах, что свидетельствует об отсутствии пролиферации клеток. На средах MS-N и MS-2N, дополненных 2 мг/л БАП в основании отдельных завязей наблюдалось образование небольшого каллуса. Он имел белую окраску и рыхлую, «водянистую» структуру. Такую морфологию у кукурузы имеют обычно неморфогенные каллусы (рисунок 5, а, б).



а – на среде MS-N с 2,0 мг/л БАП; *б* – на среде MS-2N с 2,0 мг/л БАП; *в* – на среде MS-2N с 0,5 мг/л БАП

Рисунок 5 – Неопыленные завязи кукурузы через 7 месяцев от начала культивирования

Гистологический анализ завязей, зафиксированных через 7 месяцев от начала культивирования показал, что в дегенерирующих эксплантах (рисунок 5, в) признаки дегенерации в первую очередь появлялись в семязачатках (рисунок б). Сначала дегенерировали клетки семяножки (фуникулуса) и халазы, а затем

процессы дегенерации распространялись постепенно на весь семязачаток. При этом клетки цветоложа сохраняли жизнеспособность, но очагов пролиферации в нем не наблюдалось. В завязях, которые через 7 месяцев культивирования сохранили свою жизнеспособность, соматические клетки семязачатков не имели признаков дегенерации. В семязачатках либо полностью отсутствовал зародышевый мешок (рисунок 7, а), либо в них присутствовали дегенерирующие остатки зародышевого мешка (рисунок 7, б). Это вполне ожидаемо, поскольку для гаплоидов характерно неправильное расхождение хромосом в ходе мейоза, что, в свою очередь, приводит к нарушению процессов спорогенеза и гаметофитогенеза.

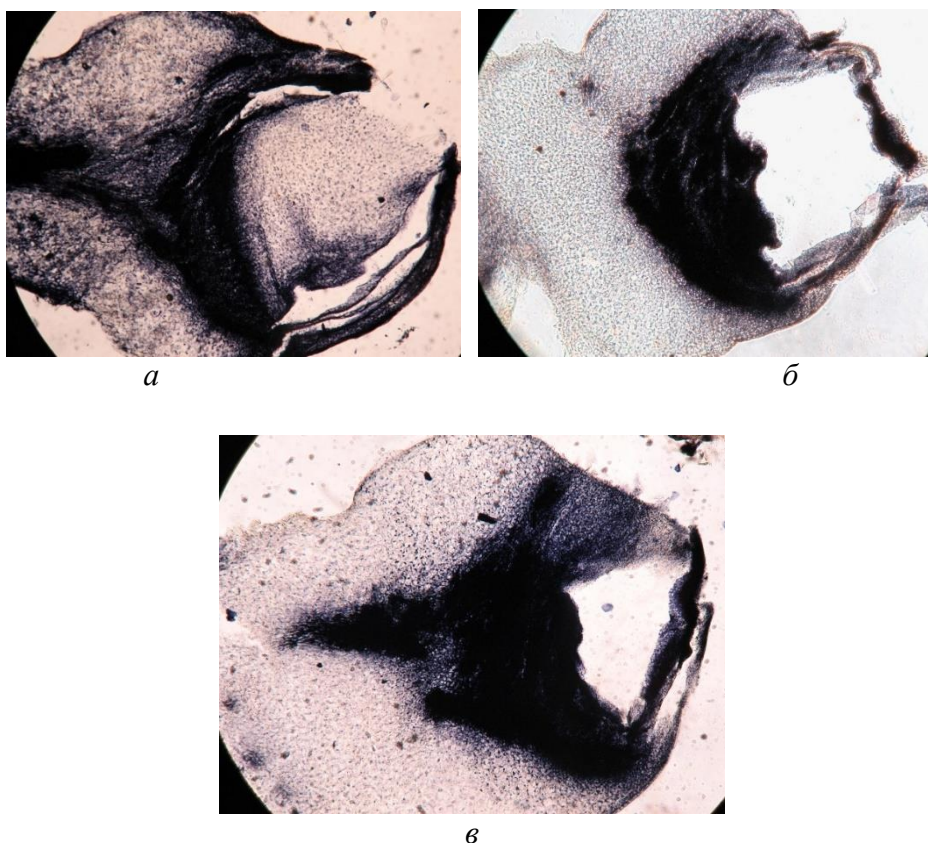
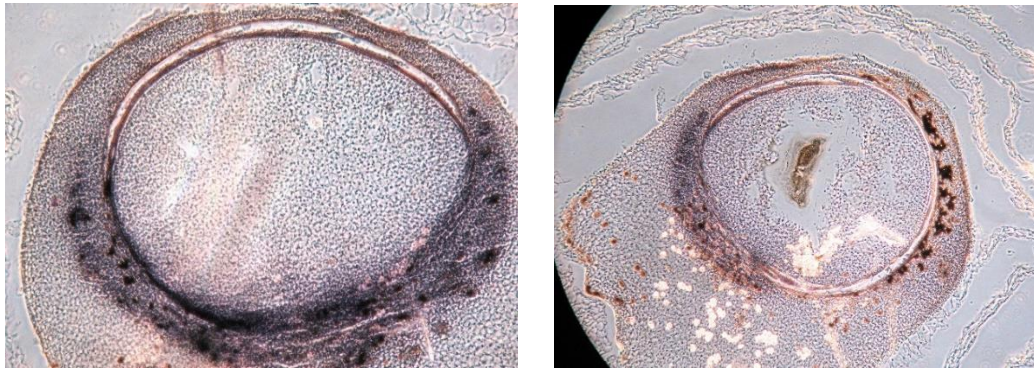


Рисунок 6 – Экспланты с дегенерирующим семязачатком после 7 месяцев культивирования на среде MS-N, дополненной 2,0 мг/л БАП



a

б



в

a – без зародышевого мешка; *б* – с дегенерировавшим зародышевым мешком; *в* – с зародышевым мешком аномального строения

Рисунок 7 – Завязи кукурузы после 7 месяцев культивирования на среде на среде MS-N с 2,0 мг/л БАП

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что приживаемость завязей в культуре *in vitro* не зависит от наличия в семязачатках зародышевого мешка, а зависит от состава питательной среды. Установлено, что перспективным индуктором морфогенеза является БАП. На средах с добавлением этого гормона изолированные завязи приживались с высокой частотой, большая часть из них сохраняла жизнеспособность на протяжении длительного времени (более 7 месяцев), на среде MS-N и MS-2N с добавлением 2,0 мг/л БАП у единичных завязей отмечено формирование небольшого каллуса. Наиболее эффективной средой для инициации стерильной культуры неопыленных завязей гаплоидных растений кукурузы является среда MS-N с 2,0 мг/л БАП. На этой среде наблюдался не только высокий процент

приживаемости эксплантов (61,7%), но и сохранение жизнеспособности эксплантов в процессе длительного культивирования. Задачей дальнейших исследований по клональному микроразмножению с использованием в качестве первичных эксплантов изолированных завязей гаплоидных растений кукурузы должен стать подбор наиболее оптимальной концентрации БАП для индукции прямых или непрямых путей морфогенеза.

Выводы:

1. Эффективность введения в культуру *in vitro* неопыленных завязей гаплоидных растений кукурузы определяется как индуктором морфогенеза, так и содержанием в среде минеральных компонентов и сахарозы. Добавление в среду MS в качестве индуктора морфогенеза ауксина 2,4 Д приводило к 100% гибели первичных эксплантов. При использовании цитокинина БАП приживаемость эксплантов варьировала от 0 до 96,7%.

2. При длительном культивирования завязей наблюдалось постепенное снижение жизнеспособности эксплантов. На средах MS-N с 0,5 мг/л БАП и MS-2N с 2,0 мг/л БАП через 7 месяцев от начала культивирования жизнеспособными оставалось около 50% инициированных завязей. На среде MS-N с 2,0 мг/л БАП практически все завязи сохраняли свою жизнеспособность через 7 месяцев от начала культивирования.

3. Гистологический анализ завязей, зафиксированных через 7 месяцев от начала культивирования показал, что приживаемость завязей в культуре *in vitro* не зависит от наличия в семязачатках зародышевого мешка, а зависит от состава питательной среды. В инициированных эксплантах клетки всех структур завязи сохраняли жизнеспособность, но при этом очагов пролиферации в них не наблюдалось.

4. Высокая приживаемость эксплантов на среде с БАП и сохранение их жизнеспособности в течение длительного периода культивирования (7 месяцев) свидетельствуют о перспективности использования этого гормона для индукции прямых или не прямых путей морфогенеза в культуре неопыленных завязей гаплоидных растений кукурузы.

1
200