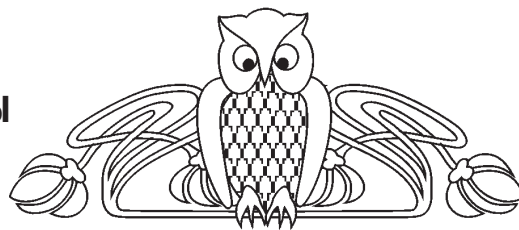




УДК 581.6:601

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Б. М. Х. Хумуд, Н. В. Апанасова, О. И. Юдакова



Хумуд Бутхайна Мохаммед Хумуд, аспирант кафедры генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, bobogold18@gmail.com

Апанасова Наталия Владимировна, инженер отдела научных исследований № 1 Управления научной деятельностью, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, arapasova.natasha@mail.ru

Юдакова Ольга Ивановна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, yudakovaoi@info.sgu.ru

В настоящее время многие селекционные технологии строятся на использовании в качестве исходного материала гаплоидных растений. Однако спонтанная частота их образования крайне низкая (0,01–0,1%). В связи с этим актуально получение форм культурных растений, склонных к партеногенезу. На кафедре генетики Саратовского государственного университета создана коллекция линий кукурузы с повышенной частотой образования в потомстве гаплоидных растений. Поддержание растительных коллекций в полевых условиях сопровождается высокими затратами, тогда как современные технологии *in vitro* дают возможность более эффективно организовать работу по сохранению гермоплазмы. Целью исследования явилась разработка технологии клонального микроразмножения растений линий кукурузы для создания в дальнейшем коллекции асептических культур партеногенетических форм. В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши, которые вычленили из зерновок, обработанных коммерческим препаратом «Белизна» в разведении 1:1 в течение 5 мин. Наиболее эффективной для этапа инициации стерильной культуры оказалась среда, состоящая только из агара и воды, а для этапа собственно микроразмножения – среда MS, дополненная БАП 0.5 мг/л.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, культивирование *in vitro*, эмбриокультура, партеногенез, кукуруза.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

Гаплоиды, или особи с одинарным набором хромосом, являются ценным материалом для решения различных прикладных и фундаментальных научных проблем. Использование гаплоидов в селекции позволяет быстро оценивать растения по генотипу и эффективно осуществлять работы по экспериментальному мутагенезу, проводить отбор в первом поколении на провокационном фоне, быстро создавать гомозиготные чистые линии путем диплоидизации гаплоидов и др. [1]. Частота спонтанного развития в потомстве

гаплоидных растений крайне низкая. Например, у кукурузы она составляет 1:1000 [2]. Даже с использованием современных методов индукции гаплоидии, ее частоту удастся увеличить всего лишь с сотых долей до нескольких процентов [3–9]. Решение проблемы повышения эффективности индукции гаплоидии осложняет недостаточная изученность генетических механизмов партеногенеза. Модельным объектом для исследования данных механизмов, а впоследствии и донором генетических факторов партеногенеза могут стать линии со стабильно наследуемой повышенной частотой образования гаплоидов. Путём отбора и целенаправленной селекции на кафедре генетики Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского была создана коллекция гомозиготных линий кукурузы, предрасположенных к наследуемому партеногенезу [9–13]. Поддержание растительных коллекций в полевых генных банках высокочастотной, для них необходимы большие площади, тщательный и своевременный уход с использованием ручного труда. Современные технологии *in vitro* дают возможность более эффективно организовать работу по созданию и сохранению гермоплазмы. Они позволяют продолжительно хранить и мультиплицировать растительный материал в асептических условиях, освобождать его от вирусных, бактериальных, грибных заболеваний, при этом экономить площади под коллекциями и затраты труда для их поддержания. В связи с этим актуальным является создание и развитие коллекции асептических культур растений партеногенетических линий кукурузы.

Накопленный к настоящему времени опыт размножения растений в культуре *in vitro* свидетельствует о невозможности создания одной универсальной технологии клонирования, так как эти технологии зависят не только от вида растения, но часто и от конкретного генотипа. Целью данного исследования явилась разработка технологии клонального микроразмножения растений партеногенетических линий кукурузы. В задачи первого этапа входило:

- 1) подбор метода стерилизации растительного материала для введения в стерильную культуру зрелых зародышей кукурузы;



2) тестирование питательных сред различного минерального и фитогормонального состава для инициации стерильной культуры.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили две линии кукурузы АТ-ТМ (bm,wx,y) и АТ-ТМ (lg, y), которые склонны к наследуемому партеногенезу и регулярно дают в потомстве матроклинные гаплоиды [10–13].

В качестве первичных эксплантов использовали зрелые зародыши, которые выделяли с помощью препаровальных игл из обработанных стерилизующими растворами зерновок. В качестве стерилизующих агентов использовали коммерческий препарат «Белизна» (действующее вещество – гипохлорит натрия), синтетическое моющее средство (СМС) и препарат «Фундазол» в разных сочетаниях и с разной экспозицией. Всего было протестировано 6 вариантов стерилизации: 1) «Белизна» (в разведении 1:1), 5 мин; 2) «Белизна» (1:1), 10 мин; 3) «Белизна» (1:1), 20 мин; 4) «Белизна» (1:1), 5 мин, СМС 1%, 15 мин; 5) «Белизна» (1:1), 15 мин, СМС 1%, 20 мин; 6) «Фундазол» 1%, 5 мин.

Для инициации культуры зрелых зародышей использовали среды: агар–вода и Мурасиге–Скуга, MS [14], с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreas). В качестве индуктора морфогенеза использовали 6-бензиламинопурин (БАП). рН сред корректировали до 5,8–6,0 до автоклавирования. Среду автоклавировали 20 мин при 120°C. Этапы инициации стерильной культуры проводили в

чашках Петри, этапы размножения – в стеклянных колбах объемом 200 мл. В чашки Петри и колбы добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в климатокамере Sanyo MLR-352 при температуре 24°C при 16-часовом фотопериоде.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Оптимальная процедура стерилизации должна давать наименьшее количество инфицированного растительного материала и при этом не снижать его жизнеспособность. Обработанные стерилизующими агентами зерновки кукурузы помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и через 7 сут. определяли размер проростков и количество инфицированных зерновок. Эффективными для обеих линий оказались варианты стерилизации 1, 2 и 6 («Белизна» 5 мин; «Белизна» 10 мин; «Фундазол» 5 мин) (рис. 1). Однако линия АТ-ТМ (lg, y) была более чувствительна к стерилизующим растворам, и в некоторых вариантах предобработка семян угнетала процессы их прорастания. В частности, во втором варианте изученные линии достоверно отличались по длине проростков (рис. 2). Таким образом, наиболее эффективными для обеих линий можно считать вариант 1 и 6. В дальнейшей работе для стерилизации растительного материала использовали вариант 1 («Белизна» в разведении 1:1, 5 мин) как наиболее доступный и простой в использовании.

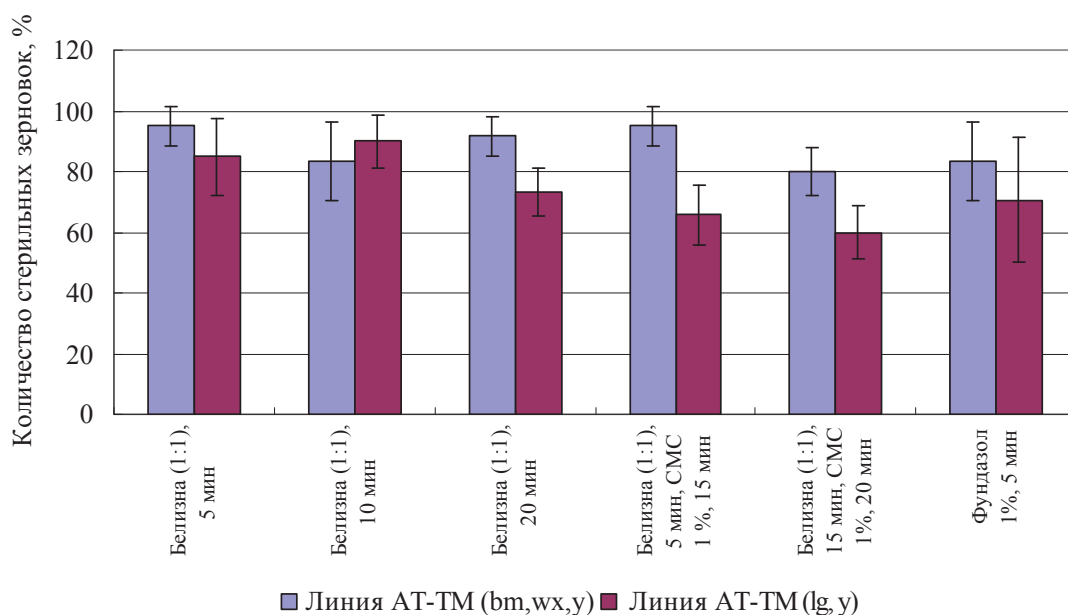


Рис. 1. Эффективность разных вариантов стерилизации зерновок кукурузы через 7 сут. после обработки

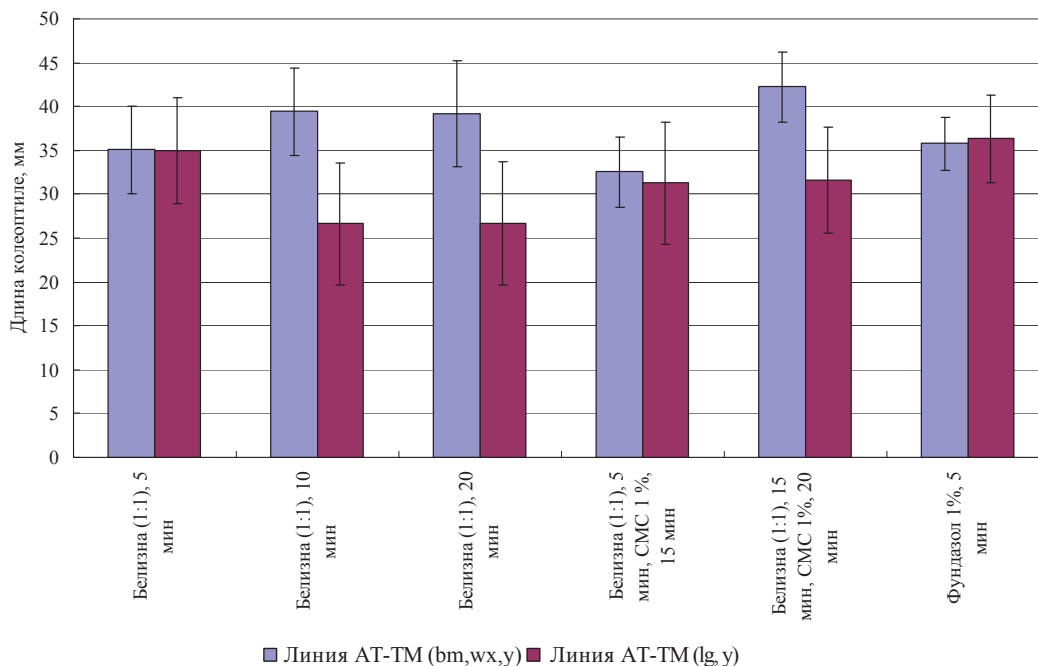


Рис. 2. Длина coleoptиле проростков кукурузы на 7-е сут. после обработки зерновок стерилизующими растворами

Для инициации стерильной культуры было апробировано три состава искусственных сред: 1) агар–вода; 2) среда MS без добавления гормонов; 3) среда MS, дополненная БАП в концентрации 0,5 мг/л.

На всех питательных средах изолированные зародыши прорастали с частотой около 90%. Однако на средах MS у проростков наблюдалась витрификация тканей и различные морфозы (недоразвитие coleoptиле, закручивание листьев и изменение их формы) (рис. 3, б). Вследствие этого для инициации стерильной культуры был выбран

способ проращивания зрелых зерновок на среде, состоящей только из агара и воды.

После того как проростки достигали величины 2–3 см, у них удаляли корень и переносили на среды для собственно микроразмножения. На данном этапе важно подобрать такой состав питательных сред, которые снимали бы апикальное доминирование, стимулировали образование побегов из пазушных меристем, но при этом подавляли развитие корней. Как известно, образование корней обычно препятствует мультпликации побегов.

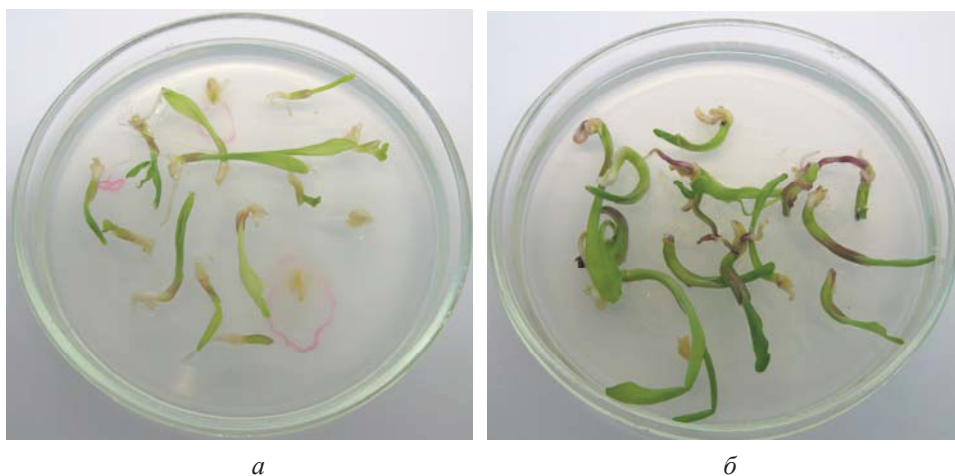


Рис. 3. Влияние состава питательной среды на проращивание зрелых зародышей кукурузы (через 7-е сут. от начала культивирования): а – нормальные проростки на среде агар–вода; б – проростки с закрученными листьями на среде MS без добавления гормонов



Было протестировано 3 варианта сред: 1) MS без гормонов; 2) MS, дополненная БАП в концентрации 0.5 мг/л; 3) 1/2MS, дополненная БАП в концентрации 0.5 мг/л. На безгормональной среде наблюдался активный рост побега, апикальное доминирование и развитие корня (рис. 4, а). На среде 1/2MS БАП 0.5 мг/л корни отсутствовали, но

рост побега был замедлен, и пазушные побеги не развивались (см. рис. 4, б). Наиболее эффективной оказалась среда MS БАП 0.5 мг/л. В этом варианте у эксплантов не формировались корни, побеги были несколько укорочены и в базальной части первичного побега происходило развитие пазушных меристем в боковые побеги (см. рис. 4, в).

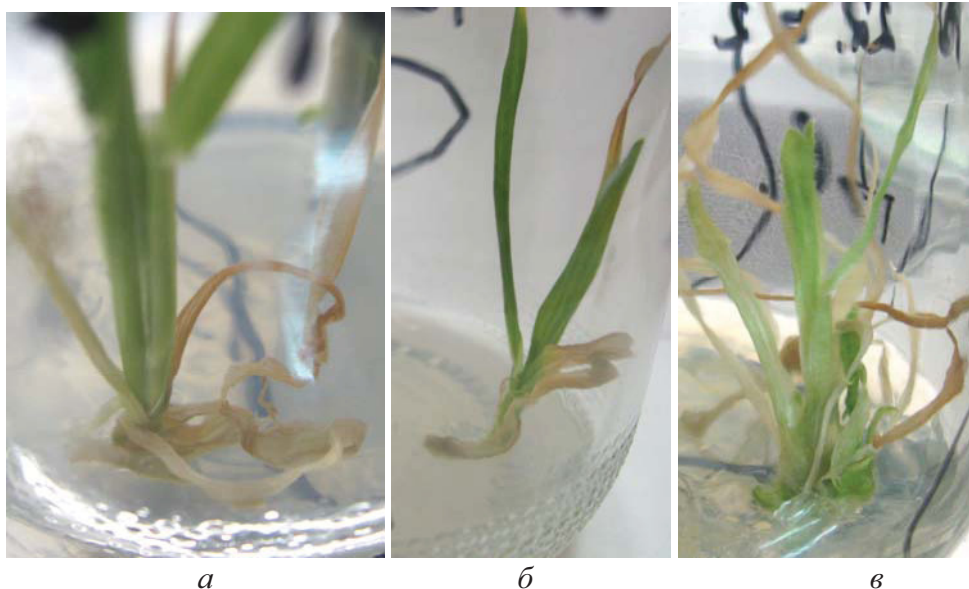


Рис. 4. Влияние состава питательной среды на развитие проростков кукурузы через 1 месяц культивирования: а – апикальный рост побега и образование корней у проростков на среде MS без добавления гормонов; б – апикальный рост побега без корней на среде MS, дополненной БАП 0.5 мг/л; в – образование побегов из пазушных меристем на среде 1/2 MS, дополненной БАП 0.5 мг/л

Таким образом в ходе проведенного исследования были подобраны эффективные варианты стерилизации растительного материала и среды для инициации стерильной культуры зрелых зародышей и мультипликации побегов.

Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 6.8789.2017/БЧ.

Список литературы

1. Тырнов В. С. Гаплоидия у растений : научное и прикладное значение. М., 1998. 54 с.
2. Chase S. S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) // Bot. Rev. 1969. Vol. 35, № 2. P. 117–168.
3. Суханов В. М., Тырнов В. С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток // Гаплоидия и селекция. Саратов, 1976. С. 99–110.
4. Лантев Ю. П. Гетероплоидия в селекции растений. М., 1984. 248 с.

5. Круглова Н. Н. Микроспора как модельная система для изучения путей морфогенеза : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Уфа, 2002. 48 с.
6. Дьячук Т. И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии (на примере пшеницы и ячменя) : дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2003. 290 с.
7. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. Haploids : Constraints and opportunities in plant breeding // Biotechnology Advances. 2015. Vol. 33. P. 812–829.
8. Hu H., Schrag T. A., Peis R., Unterseer S., Schipprack W., Chen S., Lai J., Yan J., Prasanna B. M., Nair S. K., Chaikam V., Rotarencu V., Shatskaya O. A., Zavalishina A., Scholten S., Schön C. C., Melchinger A. E. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // Genetics. 2016. Vol. 202. P. 1267–1276.
9. Еналеева Н. Х., Тырнов В. С. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272, № 3. С. 722–725.
10. Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Коллекция генетически маркированных линий кукурузы с повышенной частотой партеногенеза // 50 лет ВОГиС : успехи и перспективы : тез. Всерос. конф. (Москва, 8–10 нояб. 2016 г.). М., 2016. С. 72.



11. Гуторова О. В., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самар. науч. центра Российской академии наук. 2016. Т. 18, № 2(2). С. 341–344.
12. Апанасова Н. В., Смолькина Ю. В., Юдакова О. И. Проявление признаков партеногенеза у кукурузы в различной генотипической среде // Селекция растений : прошлое, настоящее и будущее : сб. материалов I Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 140-летию НИУ «БелГУ» и 100-летию со дня рождения селекционера, ученого и педагога, доктор сельскохозяйственных наук, профессора З. И. Щелоковой (Белгород, 24–26 ноября 2016 г.) / под общ. ред. Е. В. Думачевой. Белгород, 2017. С. 9–12.
13. Апанасова Н. В., Гуторова О. В., Юдакова О. И., Смолькина Ю. В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самар. науч. центра Российской академии наук. 2017. Т. 19, № 2 (2). С. 216–219.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines

B. M. H. Humood, N. V. Apanasova, O. I. Yudakova

Buthaina M. H. Humood, ORCID 0000-0001-9509-8562, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, bobogold18@gmail.com

Образец для цитирования:

Хумуд Б. М. Х., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 320–324. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

Cite this article as:

Humood B. M. H., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 320–324 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

Natalia V. Apanasova, ORCID 0000-0002-5496-0862, Saratov State University, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, apanasova.natasha@mail.ru

Olga I. Yudakova, ORCID 0000-0003-1391-6803, Saratov State University, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, yudakovaoi@info.sgu.ru

Many modern selection technologies are based on the use of haploid plants as a starting material. The spontaneous frequency of haploid development is very low (0.01–0.1%). In this regard, the creation of plant forms with increased frequency of parthenogenesis is important. The collection of corn lines with an increased frequency of haploid plants in the progeny was created at the Department of Genetics of the Saratov State University. High costs are required for maintain of a plant collections in the field. Modern *in vitro* technologies allow more efficient organize the works on creation and preservation of germplasm. The aim of the study is the introduction of plants of parthenogenetic lines into a culture *in vitro* to create a collection of aseptic cultures of parthenogenetic maize forms. Mature embryos were used as a primary explants. Embryos were isolated from the grains, treated by the commercial preparation "Belizna" in a dilution of 1:1 within 5 minutes. The most effective medium on the stage of initiation of a sterile culture was a medium consisting only of agar and water. The MS medium supplemented with BAP 0.5 mg/l was a most effective on the stage of micropropagation.

Key words: micropropagation, *in vitro*, embryoculture, parthenogenesis, corn, *Zea mays* L.

Acknowledgments: The work was carried out with the partial financial support of the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the state task in the sphere of scientific activity on the assignment no. 6.8789.2017/BCh.