

УДК 581.6:601

Хумуд Бутхайна Мохаммед Хумуд, Юдакова О. И.

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Россия

e-mail: yudakovaai@info.sgu.ru

ИНДУКЦИЯ ПРЯМОГО ОРГАНОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ

Регенерация растений в культуре *in vitro* может происходить как за счет активации уже существующих меристем экспланта посредством прямого органогенеза, так и через каллусные культуры с последующим развитием побегов или эмбриоидов *de novo*. Высокая степень генетической изменчивости клеток каллуса является причиной соматклональной изменчивости, которая в зависимости от конечных целей эксперимента может иметь как положительное, так и отрицательное значение. Например, она важна для увеличения генетического разнообразия исходного материала, но крайне нежелательна в тех случаях, когда требуется сохранить исходный генотип.

В настоящее время у кукурузы стабильно высокая частота регенерации растений получена в основном посредством соматического эмбриогенеза, тогда как успешные работы по индукции прямого органогенеза выполнены лишь для единичных генотипов. Целью данного исследования явилась разработка технологии клонального микро-размножения кукурузы в культуре зрелых зародышей.

Материалом исследования послужили линии 'АТТМ (bm, y)' и 'АТТМ (bm, wx, gl, на Боливийской цитоплазме)', выведенные в Саратовском госуниверситете и характеризующиеся повышенной частотой образования в потомстве матроклинных гаплоидов. В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши. Зерновки стерилизовали 70 % этиловым спиртом и 0,1 % ртутьсодержащим раствором. Из стерильных зерновок вычленили зародыши и пассировали их в чашки Петри на искусственную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreac) без гормонов. На данной питательной среде изолированные зародыши у обеих линий прорастали с частотой около 90 %.

Для индукции морфогенеза развившиеся проростки через 7 сут от начала культивирования срезали и переносили на среду MS с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5 или 2,0 мг/л. Выявлено влияние генотипа на приживаемость эксплантов. Для линии 'АТТМ (bm, wx, gl, на Боливийской цитоплазме)' она составила в среднем 40 и 38 %, а для линии 'АТТМ (bm, y)' – 80 и 92 % на средах с 0,5 и 2,0 мг/л БАП, соответственно.

У изученных линий на средах для размножения морфогенез осуществлялся одинаково. У проростков в зоне базального среза клетки

приобретали коричневую окраску. Формирования каллуса и корней не происходило. Проростки росли и через 3–4 нед культивирования состояли из нескольких укороченных междоузлий с 4–5 настоящими листьями. Гистологический анализ развившихся побегов показал, что в зоне узла, ближайшего к поверхности питательной среды, в пазухе листа формируется несколько пазушных почек, которые затем прорастают в пазушные побеги. Концентрация БАП в среде оказывала влияние на скорость образования пазушных почек и их количество. На среде, дополненной 0,5 мг/л БАП, заложение одной или двух почек происходило на 3–4 нед культивирования, тогда как на среде, дополненной 2,0 мг/л БАП, 7–10 почек формировалось уже на первой и второй недели культивирования. При этом пазушные почки развивались не только в зоне ближайшего к поверхности среды узла, но и на выше расположенных узлах. Через 5 нед культивирования на среде с 0,5 мг/л БАП регенерант внешне выглядел как один побег. Образовавшиеся короткие боковые побеги можно было увидеть только после удаления листьев. На среде с 2 мг/л БАП через 5 нед культивирования регенерант представлял собой пучок из многочисленных укороченных побегов, связанных между собой единой проводящей системой.

Для удлинения развившихся боковых микропобегов их, не разделяя, переносили на среду MS без гормонов или MS с 0,2 мг/л БАП. На безгормональной среде побеги не удлинялись и желтели, на среде с пониженным содержанием БАП происходило удлинение побегов, что позволяло разделять их и переводить на среды с ауксинами для дальнейшего укоренения. Следует отметить, что на среде с пониженным содержанием БАП у некоторых побегов спонтанно развивались корни.

Таким образом, нами была успешно проведена индукция прямого органогенеза для двух генотипов кукурузы, подобраны оптимальные среды для инициации стерильной культуры и собственно микроразмножения; выявлено влияние концентрации БАП в среде для размножения на количество и длину пазушных побегов, влияние генотипа на приживаемость побегов изученных линий в культуре *in vitro* и отсутствие влияния генотипа на этапе собственно микроразмножения. Данные гистологического анализа свидетельствуют о том, что на среде для размножения, дополненной БАП в концентрации 0,5 или 2 мг/л БАП, происходит активации интеркалярных меристем и образование в зоне узлов пазушных почек, которые затем прорастают в боковые побеги. Развитие дополнительных побегов из существующих меристем экспланта способствует сохранению генетического единообразия культивируемого растительного материала, что позволяет использовать данную технологию для размножения элитных генотипов и проведения генноинженерных исследований.

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