

УДК 581.1.053:578:633.34

К. Р. УТЕУЛИН, А. Б. ИСКАКОВА, Г. БАРИ, С. К. МУХАМЕБЕТЖАНОВ

ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ РИСА (*ORIZA SATIVA L.*)

(Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы)

Показана зависимость индукции процессов каллусообразования и регенерации растений, в культуре незрелых зародышей казахстанских сортов риса, от генотипа исходного материала. Так, высокая активность к индукции каллусогенеза отмечена у сортов Баканасский, Хазар, Лидер, у которых 95 процентов зародышей проявили способность к формированию каллусной ткани в условиях *in vitro*. У сорта Регул этот показатель был несколько ниже и составил 90 процентов. Сорта Мадина и Маржан индуцировали каллусогенез с частотой 84 и 83 процента, соответственно. Каллусы испытанных сортов обладали неодинаковыми органогенными потенциями. Так, морфогенные каллусы сорта Мадина успешно регенерировали растения с частотой – 90,4 процента. Тогда у сортов у сортов Баканасский и Лидер регенерация достигалась в 34,2 и 20 процентах случаях, соответственно. У сортов Маржан, Хазар, Регул наблюдалось лишь пролиферирующая активность каллусов без проявления признаков органогенеза.

С помощью культуры зародышей на искусственных питательных средах можно решать ряд задач теоретического и прикладного характера. В теоретическом плане воспроизведение процессов эмбриогенеза в контролируемых условиях, позволяет изучить процессы формирования зародыша на материнском растении, выявить механизмы клеточного деления, дифференциации и морфогенеза. В практическом отношении, эмбриокультура позволяет решить проблему постгамной несовместимости и получать гибридные линии в комбинациях, где традиционные методы гибридизации оказываются малоэффективными. Следует отметить, что культура зародышей может быть использована и для ускорения селекционного процесса путем прерывания покоя семян, сокращения цикла репродукции растений, преодоления самостерильности семян, быстрой оценки семян на всхожесть [1, 2].

Все исследования по культуре зародышей *in vitro* разделяют на две группы. К первой группе относится культивирование зрелых, в основном, сформированных зародышей. Ко второй группе – культивирование зародышей на ранних стадиях развития, т. е. слабо дифференцированных зародышей. Выращивание зрелых зародышей не представляет методических трудностей и легко осуществляется при сохранении стерильности на сре-де сравнительно простого состава. Тогда как незрелые зародыши более требовательны к химическим и физическим факторам культивирования.

В настоящее время для риса показана принципиальная возможность успешного получения регенерации растений в культуре незрелых зародышей [1, 3, 4]. Вместе с тем, при введении в культуру *in vitro* новых сортов, необходимы дополнительные исследования по оптимизации состава питательных сред и условий культивирования, для увеличения частоты выхода каллусной ткани и регенерации растений. Данная проблема является актуальной и для сортов риса казахстанской селекции.

Цель предпринятого исследования заключалась в изучении зависимости процессов индукции каллусогенеза и последующей регенерации растений из незрелых зародышей риса *in vitro* в зависимости от генотипа родительских растений.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были использованы сортообразцы риса: Баканасский, Мадина, Маржан – казахстанской селекции, Хазар, Лидер, Регул – российской селекции. Растения выращивали при температуре 25°C и с 16-часовым периодом освещения, в условиях фитотрона. Метелки отбирали у растений, прошедших фазу цветения, на 10-12 день после опыления. Незрелые зародыши вычленяли из зерновок, находящихся на стадии молочной спелости (рис. 1).

Зародыши культивировали по методикам описанной Guzman E.V. (1983), Christou P. и Klee H. (2004) [1, 4].

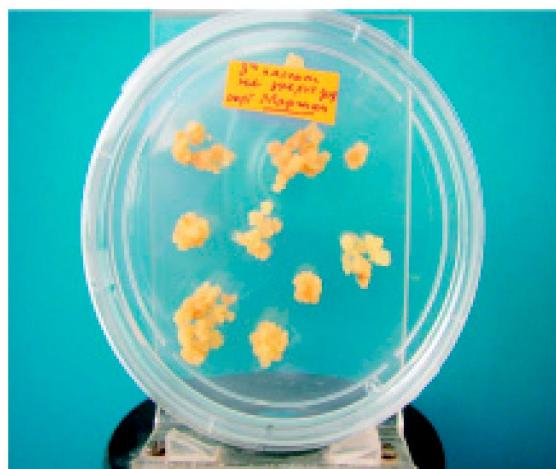
Рис. 1. Зерновки риса на стадии молочной спелости



В качестве основной, использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [6]. На ее фоне изучали действие фитогормонов ауксиновой (НУК; 2,4-Д) и цитокининовой (кинетин) природы на образование каллуса и последующей регенерацией из него растений.

Для индукции каллусогенеза использовали среду МС с добавлением в нее 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара и 2 мг/л 2,4-Д. Пробирки с изолированными зародышами помещали в термостат и инкубировали при температуре 22°C в темноте, до образования первичного каллуса.

Полученную каллусную ткань для роста и индукции морфогенетических процессов, последующей регенерации растений переносили на среду МС, содержащую 2 мг/л кинетина, 0,2 мг/л НУК и культивировали при температуре 26–28°C, интенсивности освещения 9 kLx с 12 25°C с 12 часовым фотопериодом.



α

Полученные *in vitro* растения с хорошо развитыми корнями, извлекали из пробирок и переносили в почвенный субстрат для их адаптации к условиям фитотрона.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов установлено, что через 5 дней от начала культивирования на нижней части зародыша, со стороны щитка начинается дедифференциация клеток тканей его составляющих, что приводило на 10 день к образованию каллусной ткани. При этом формировалась два типа каллусов различающихся по окраске. Первый тип имел зернистую структуру и выраженный желтый цвет, второй – зернистую структуру и соломенный цвет (рис. 2). Каллусные ткани, полученные из незрелых зародышей, успешно субкультивировались и были доведены до третьего и четвертого пассажей. Анализ



β

Рис. 2. Индукция каллусогенеза из незрелых зародышей риса: *α* – каллус первого типа, *β* – каллус второго типа

данных, полученных в результате проведенных экспериментов, показал влияние генотипа исходных сортообразцов риса на процессы образования каллуса, его пролиферации, роста и развития на культуру незрелых зародышей в асептических условиях. Так, высокая активность к индукции новообразований отмечена у сортов Баканаский, Хазар, Лидер, у которых 95 процентов зародышей проявили способность к формированию каллусной ткани в условиях *in vitro*. У сорта Регул этот показатель был несколько ниже и составил 90 процентов. Сорта Мадина и Маржан индуцировали каллусогенез с частотой 84 и 83 процента, соответственно. Следует отметить, что в проведенных нами предварительных экспериментах по культивированию зрелых зародышей риса этих же сортообразцов, процент выхода каллуса был значительно ниже и варьировал в пределах от 7 до 73 процентов.

Таким образом, можно заключить, что для получения первичного каллуса в эмбриокультуре риса более эффективно использовать незрелые зародыши.

Полученные первичные каллусы переносили на среду для их пролиферации, роста и индукции морфогенетических процессов, которые протекали в последовательности ризогенез – геммогенез – гемморизогенез – регенерация (рис. 3).



Рис. 3. Этапы регенерации растений в культуре незрелых зародышей риса:
а – каллусогенез; г – геммогенез;
в – гемморизогенез; б – растение регенерант

Через неделю после пассирования, на каллусах появлялись очаги дифференцировки, в виде зеленых меристематических участков, из которых при дальнейшем культивировании образовывались эмбриоподобные структуры, в виде глобул. После второго пассажа морфогенных каллусов, на 25-30 день из них развивались корни и побеги. Регенерация растений достигалась после третьего и четвертого пассажей на свежие питательные среды того же состава. Растения регенеранты выращивали в пробирках на свету до переноса их в почвенный субстрат.

Генотип исходных растений также оказывал влияние на способность первичных каллусов к индукции морфогенетических процессов и регенерации растений. Каллусы испытанных сортов обладали неодинаковыми органогенными потенциями. Так, морфогенные каллусы сорта Мадина успешно регенерировали растения с частотой – 90,4 процента. Тогда у сортов Баканаский и Лидер регенерация достигалась в 34,2 и 20 процентах случаях, соответственно. У сортов Маржан, Хазар, Регул наблюдалось лишь пролиферирующая активность каллусов без проявления признаков органогенеза.

Регенеранты, с хорошо развитыми корнями, переносили в контейнеры с почвенной смесью, на 3-5 дней прикрывали стеклянными колпаками для адаптации к условиям открытого грунта. Прошедшие первичную акклиматизацию растения пересаживали в почву и доращивали в условиях фитотронса до стадий цветения и созревания.

Растения-регенеранты из каллусов первого пассажа характеризовались меньшей фенотипической изменчивостью и мало отличались от исходных родительских растений, из которых индуцирована каллусная ткань, тогда как растения, полученные из каллусов поздних пассажей, по некоторым фенотипическим признакам (длина растений и метелок, количество побегов на узле кущения), имели различия между собой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guzman E.V. Recent progress in rice embryo culture. In IRRI Workshop Cell and tissue techniques for cereal crop improvement. Beijing, Science Press, 1983. P. 215-228.
2. Chalwa H.S. Introduction to plant biotechnology. 3-rd Edn. Oxford and Ibh, 2009. 730 p.
3. Li K.L., Liu L.F. Induction and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plants (*Oryza sativa* L.) // Jpn. J. Crop. Sci. 1982. V. 51. P. 70-74.

4. Koetje D.S., Grimes H.D., Wang Y.C., Hodges T.K. Regeneration of indica rice (*Oryza sativa L.*) from primary callus derived from immature embryos // J. Plant Physiol. 1989. V. 135. P. 184-190.
5. Christou P., Klee H. Handbook of plant biotechnology. Wiley, 2004. 1488 p.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473-479.

Резюме

Қазақстан күріш сорттарының жетілмеген ұрықтарын жасанды жағдайда өсіруге каллусогенез және регенерация процестеріне генотиптің өсері көрсетілген. Сорттар Бақанас, Хазар, Лидер *in vitro* жағдайында 95 пайыз жетілмеген ұрықтар калус үлпаларының және каллусогенез индукциясына жоғарғы қалыптасуына белсенділігін танытты. Ал Регул сорты бірнеше тәмен көрсеткіште және 90 пайызды құрады. Сорттар Мадина мен Маржан индукциялық каллусогенезінің жиілігі 84 және 83 пайызға сәйкес келді. Зерттелген сорттардың каллустары органогендік жағынан бірдей болған жоқ. Сонымен қатар

Мадина сортының морфогендік каллусы және регенерациялық өсімдіктері жиілік жағынан – 90,4 пайызды көрсетті. Ал, Бақанас және Лидер сорттарының регенерациялары 34,2 және 20 пайызға сәйкес келді. Маржан, Хазар, Регул сорттарында органогенез белгілері байқалмайтын каллус алынуына белсенділік таныты.

Summary

In present article an influence of genotype to callus induction and plant regeneration on immature culture of Kazakh rice is shown. So, high activity to callus induction is noted at cultivars Bakanassy, Hazar the Leader at which 95 percent of germs have shown ability to callus induction *in vitro*. At a cultivar Regul this indicator was slightly more low and has made 90 percent. Cultivars Madina and Marzhan induced callusogenesis with frequency of 84 and 83 percent, accordingly. The callus tested cultivars possessed unequal morphogenic potentialities. So, morphogenic callus cultivar Madina successfully regenerated plants with frequency 90,4 percent. Cultivars Bakanassy and Leader regeneration was reached in 34,2 and 20 percent cases, accordingly. At cultivars Marzhan, Hazar, Regul it was observed only callus proliferation without display of signs of organogenesis.