

УДК 573.086; 581.085

¹Бакенова Д.Т., ²Бари Г.Т., ²Утеулин К.Р., ²Искакова А.Б.

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ИЗ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ РИСА

(¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
²Институт биологии и биотехнологии растений)

Показана зависимость индукции процессов каллусообразования и регенерации растений в культуре зрелых зародышей казахстанских сортов риса от генотипа исходного материала и состава питательной среды.

В настоящее время для Казахстана является актуальным создание нового, представляющих интерес для селекции риса исходного материала, сочетающего высокую продуктивность и устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Большую помощь в решении данной проблемы могут оказать широко используемые в современных селекционных программах биотехнологические подходы и методы, к которым относится эмбриокультура. Основным интерес к культуре зародышей обусловлен тем, что метод позволяет решить проблему постгамной несовместимости и получать гибридные линии в комбинациях, где традиционные методы гибридизации оказываются малоэффективными. Кроме того эмбриокультура может быть использована и для ускорения селекционного процесса путем прерывания покоя семян, сокращения цикла репродукции растений, преодоления самостерильности семян, быстрой оценки семян на всхожесть.

К сожалению в Казахстане метод эмбриокультуры связанный с выращиванием зрелых зародышей риса в условиях *in vitro* до настоящего времени фактически не разработан, что в значительной мере тормозит его использование в прикладных целях. Это обусловлено трудностями, снижающими эффективность применения данного метода: невысокая частота индукции каллусогенеза и регенерации растений, быстрая потеря каллусом морфогенетических потенциалов при пассировании. Все это обуславливает поиск новых, более эффективных подходов для решения данной проблемы.

В последние годы для многих сортов риса показана принципиальная возможность успешного получения растений-регенерантов из зрелых зародышей культивируемых *in vitro* [1-5]. Однако для казахстанских сортов риса этот метод требует дополнительных исследований по оптимизации состава питательных сред и условий культивирования для увеличения частоты каллусогенеза и регенерации растений.

В связи с этим целью предпринятого исследования явилось изучение зависимости процессов индукции каллусогенеза и последующей регенерации растений из зрелых зародышей риса в условиях *in vitro* от генотипа исходного материала и состава питательной среды.

Материалы и методы

В качестве экспериментального материала были использованы сортообразцы риса казахстанской селекции: Баканасский и Мадина. Зрелые зародыши вычленили из зерновок под бинокулярной лупой и переносили на питательную среду.

В работе использованы общепринятые методы культуры клеток и тканей [6,7]. Для индукции каллусогенеза использовали среду МС с добавлением в нее 30 г/л сахарозы, 7 г/л агары 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 индукции морфогенетических процессов пассировали на МС среду, дополненную 2,4-Д (2 мг/л) и кинетином (1 мг/л). Для образования побегов, каллусы с очагами дифференцировки переносили на среду того же состава дополненную 0,3 г/л гидролизата казеина. В обоих случаях, каллусы переносили на свет и культивировали при температуре 25°C с 12 часовым фотопериодом.

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

Результаты и их обсуждение

Для испытанных сортообразцов риса установлена зависимость образования каллусной ткани в культуре зрелых зародышей и ее роста от генотипа родительских растений.

На 7-12 день от начала культивирования зародыши испытанных генотипов образовывали компактный каллус белого цвета (рисунок 1).

При пассировании полученных каллусов на свежую питательную среду, происходило увеличение их размеров, изменялась их консистенция и морфология. Первичный компактный каллус приобретал зернистую структуру, менял окраску с белого на желтоватый цвет (рисунок 2).

Для индукции морфогенеза каллус пассировали на свежую питательную МС среду, дополненную 2,4-Д (2 мг/л) и кинетином 1 мг/л (рисунок 3).

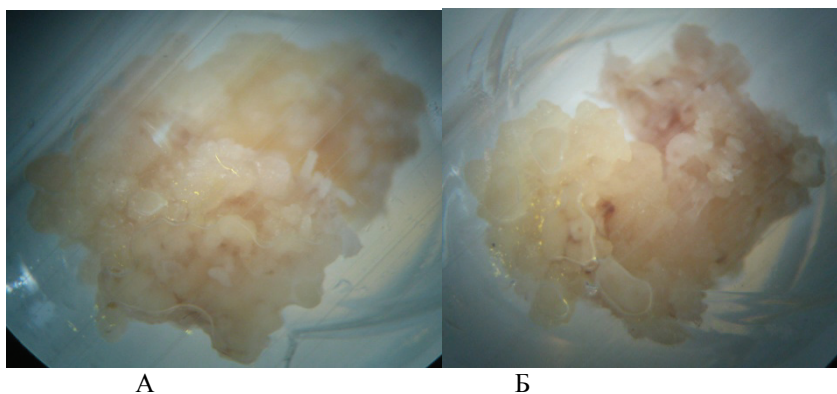


Рисунок 1 – Индукция каллусогенеза из зрелых зародышей риса сорта Баканасский (А) и Мадина (Б)

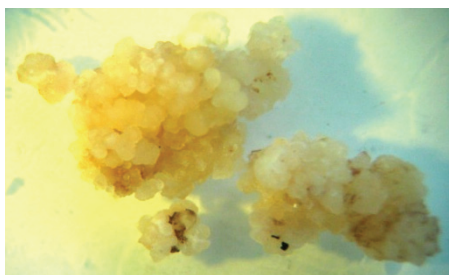


Рисунок 2 – Пролиферация каллуса полученного из зрелых зародышей

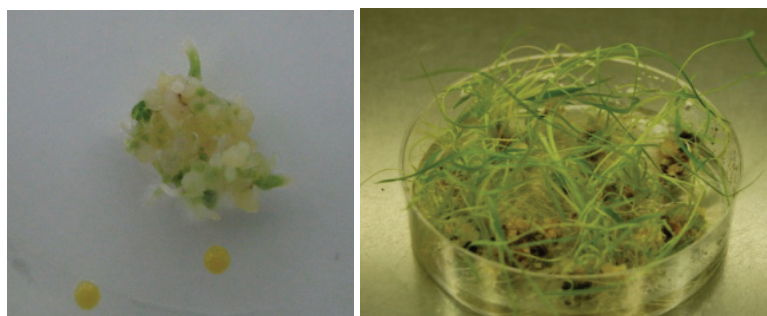


Рисунок 3 – Регенерация в каллусной культуре риса, сорт Баканасский

При этом было установлено, что генотипы с высокой каллусообразующей активностью не имели соответствующего морфогенетического потенциала. Так сорт Мадина с высокой частотой, (54 %) индукции каллусогенеза (таблица 1) имел низкую (27 %) частоту индукции геммогенеза (таблица 2). Для сорта Баканасский показана частота индукции каллусогенеза, равная 29 % (таблица 1) и регенерационной способности 59 % (таблица 2).

Таблица 1 – Частота каллусообразования риса из зрелых зародышей

Генотип	Количество эксплантов	Количество каллусов	Частота каллусообразования, %
Мадина	65	40	54
Баканас	54	20	29

Таблица 2 – Частота индукция побегообразования в каллусной культуре риса

Генотип	Количество культивируемых каллусов	Количество индуцированных побегов	Частота побегообразования, (%)
Баканасский	22	13	59
Мадина	44	12	27

Не всегда исследователям удается адаптировать регенеранты к условиям открытого грунта, некоторые растения погибают [8]. В наших исследованиях для переноса в теплицу отбирали растения только с хорошо

развитыми корнями. Перед посадкой в почву, корни растеньиц максимально очищали от остатков каллуса и агара, промывали в воде.

Для адаптации регенерантов в теплице растения накрывали пластиковыми прозрачными стаканами с отверстиями для аэрации. Это позволило создать через 3-5 дней микроклимат вокруг растеньица. Растеньица – регенеранты следует переносить в поле также с комом земли из горшка. В первые две недели в полевых условиях необходимо прикрывать растения пластиковыми прозрачными боксами.

Для успешной адаптации регенерантов к условиям открытого грунта необходим постепенный переход побегов из комфортных условий культурального контейнера в условия открытого грунта. Такой постепенный переход обеспечивается технологическими приемами, описанными выше. Адаптация проводилась в условиях оранжереи. Получены семена с растений – регенерантов (рисунок 4).

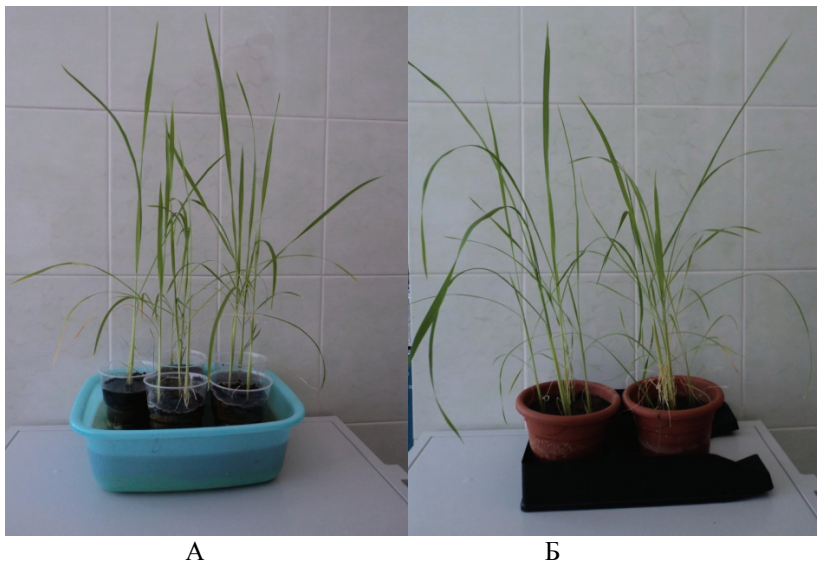


Рисунок 4 - Регенеранты риса сорт Баканасский (А) и Мадина (Б), адаптированные к условиям открытого грунта

Таким образом, проведенные исследования выявили зависимость индукции процессов каллусообразования и регенерации растений, в культуре зрелых зародышей испытанных сортов риса, от генотипа исходного материала. Вместе с тем, при выборе генотипа обладающего высокой активностью, с перспективой использования для проведения дальнейших исследований, следует учитывать как его способность к индукции каллусогенеза, так и способность к дальнейшему развитию, вплоть до регенерации целого растения.

Литература

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Seraj Z.I., Islam Z., Faruque M.O., Devi T., Ahmed S. Identification of the regeneration potential of embryo derived calluses from various indica rice varieties // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.*, 1997, V.48, P. 9-13.
- 4 Azria D., Bhalla P.L. Plant regeneration from mature embryo-derived callus of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties // *Aus. J. Agric. Res.*, 2000, V.51, P.305-312.
- 5 Niroula R.K., Sah B.P., Bimb H.P., Nayak S. Effect of genotype and culture media on callus induction and plant regeneration from matured rice grain culture // *J. Inst. Agric. Anim. Sci.*, 2005, V.26, P.21-26.
- 6 Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // *Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.*, 1984. С.42-54.
- 7 Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // *1 Чайляхян. чтение. Пуццо: Пуцинский НЦ*, 1994. С.7-26.
- 8 Yara N., Ono K., Onodera H., Tagiri A., Oka S., Tanaka S. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice // *The Plant Journal.*, 2006, V.47, P.969-976.

Тұжырым

Мақалада қазақстан күріш сорттарының жетілген ұрықтарын жасанды жағдайда өсіруге каллусогенез және регенерация процестеріне генотиптің және коректы ортаның әсерлері көрсетілген.

Summary

In present paper influence of genotype and nutrient media for callus induction and plant revering from mature embryo culture of rice is shown