

СОСТАВ СРЕД И КОНЦЕНТРАЦИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У СОРТОВ РИСА

Кучменко А.А.; Бушман Н.Ю.; Малюченко Е.А.;
Брюяко В.Н.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,
Краснодар

Аннотация. Основное назначение получения дигаплоидов в культуре пыльников - сокращение времени, необходимого для создания сортов или фиксации гетерозисного эффекта [1-4]. При традиционных методах селекции для получения гомозиготных линий необходимо 5-7 поколений, с применением культуры пыльников достаточно двух [5-7].

На данный момент известно большое число различных по составу питательных сред, но наиболее часто применяемая при выращивании изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* MS или N. Однако показана большая эффективность процесса каллусообразования на средах C и RZ [8-9]. Эти среды содержат хорошо сбалансированный состав питательных веществ, и отличается от других, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота [10].

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индо-лил-3-уксусную кислоту (ИУК), нафтилуксусную кислоту (НУК) [11-12]. В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП). 6-БАП и зеатин проявляют более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином [13-15].

Цель настоящего исследования – на примере гибридов риса исследовать особенности каллусогенеза на питательных средах различного состава и установить концентрации регуляторов роста для индукции процесса *in vitro*.

Материал и методика. Для получения дигаплоидов были использованы гибриды, полученные в результате скрещивания между сортами отечественной и зарубежной селекции, характеризующиеся рядом ценных с селекционной точки зрения качеств. Для высадки на среду использовали пыльники 70 гибридных комбинаций: гибриды между дигаплоидными линиями одной гибридной комбинации, между российскими сортами, между российскими и зарубежными образцами, межподвидовые гибриды. Для культивирования пыльников риса использовали среды с содержанием солей: повышенным $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, и более низким содержанием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а также высоким содержанием ауксинов, витаминов и регуляторов роста. Использовали 4 питательные среды: C, C₁, RZ, RZ₁ (таблица 1, 3).

Таблица 1

Состав сред с различным содержанием ауксинов и цитокининов (рН 5,6-5,8)

Код	Компоненты	мг/л			
		RZ	RZ1	C	C1
СТ 1	KNO ₃	3134,0	3134,0	2830,0	2830,0
СТ 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	370,0	185,0	185,0
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	4,4	4,4
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	1,5	1,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	231,5	231,5	463,0	463,0
СТ 3	KH ₂ PO ₄	540,0	540,0	400,0	400,0
	KI	0,83	0,83	0,8	0,8
	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	1,6	1,6
СТ 4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0	440,0	166,0	166,0
СТ 5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3
	Na ₂ M ₁₀ O ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	-	-
	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,025	0,025	-	-
	CoCL ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	-	-
Витамины					
	Тиамин HCl	2,5	2,5	1,0	1,0
	Пиридоксин HCl	2,5	2,5	0,5	0,5
	Никотиновая кислота	2,5	2,5	0,5	0,5
	Глицин	2,5	2,5	2,0	2,0
Гормоны					
	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D)	2,0	2,0	1,0	1,0
	Индалилукусная кислота	1,0	2,0	-	1,0
	Кинетин	2,0	2,0	-	2,0
	6-бензиламинопурин (6-БАП)	-	-	-	-
Мальтоза		40,000	50,000	-	-
Сахароза		-	-	30,000	30,000
Агар		7,000	7,000	8,000	8,000

Для предварительной обработки были отобраны побеги, у которых расстояние между флаговым и предпоследним листом составляло 5-10 см. Холодовая обработка метелок проходила в течение 5-12 дней при температуре 7 °С. Стерилизацию проводили в течение 20 минут 20 % раствором промышленной "Белизны" (концентрация – 5,5 г Cl/л). Подсчет каллуса проводили через каждые пять дней с 30 по 50 день после высадки пыльников на среду. На чашку Петри высаживали 50 -70 пыльников.

Для определения наиболее эффективных по составу питательных сред и ускорения работы по подсчету количества каллусов в чашках Петри разработа-

ли шкалу: меньше 5, меньше 10, меньше 15, больше 15. Использование данной шкалы позволяет проводить экспресс оценку значительных объемов материала.

Результаты и обсуждение. Высадка пыльников на питательную среду проводилась с 5 по 10 день после отбора метелок, максимальное количество каллуса отмечено при высадке на 9-10 день. В большинстве комбинаций каллус получен на 35-50 день. Из четырех вариантов сред, две (RZ₁ и RZ) повышают каллусогенез в 2 раз по сравнению со средой С (таблица 2-3).

Таблица 2

Сравнительный анализ эффективности питательных сред для каллусообразования при получении дигаплоидов в культуре пыльников

Среды	Количество чашек с высаженными пыльниками, шт.	Общее количество чашек с каллусом, шт.	Число чашек Петри с каллусом, шт.
RZ	250	157	< 5 – 94
			< 10 – 37
			< 15 – 26
			> 15 – 0
RZ ₁	250	184	< 5 – 116
			< 10 – 61
			< 15 – 1
			> 15 – 6
С	250	75	< 5 – 44
			< 10 – 23
			< 15 – 3
			> 15 – 5
С ₁	250	115	< 5 – 72
			< 10 – 22
			< 15 – 16
			> 15 – 6

Таблица 3

Эффективность каллусообразования у гибридов риса на средах с различным содержанием гормонов, %

Количество каллусов на чашках Петри, шт	RZ	RZ ₁	С	С ₁
До 5	470	580	220	360
До 10	370	610	230	220
До 15	390	15	45	240
Более 20	0	120	100	120
Всего	1230	1325	595	940

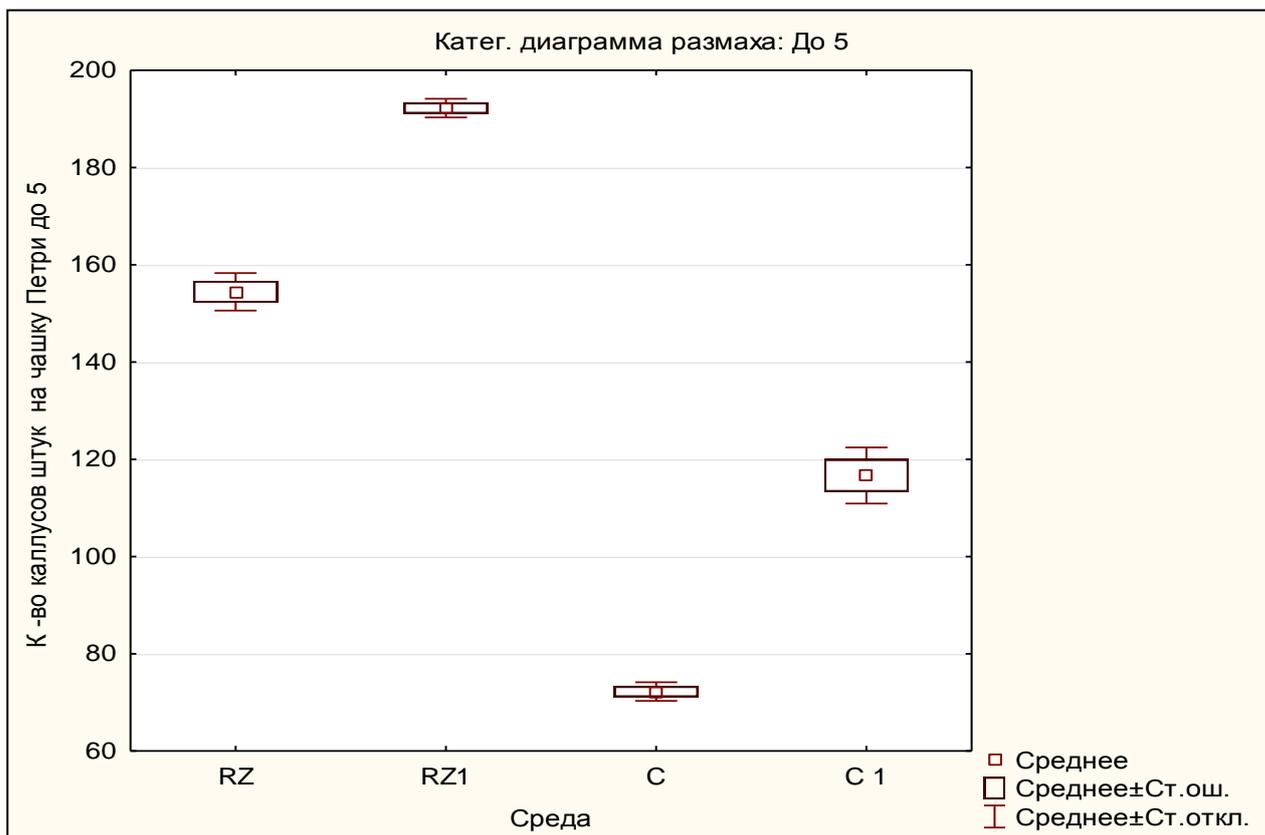


Рис. 1. Выход каллуса на средах RZ, RZ₁, C, C₁ (до 5 штук)

Среда C₁ по выходу каллуса достоверно уступает средам с повышенным содержанием солей, но в тоже время ее применение более чем в 2 раза эффективнее для получения каллуса чем среды C, не содержащей индолилуксусную кислоту.

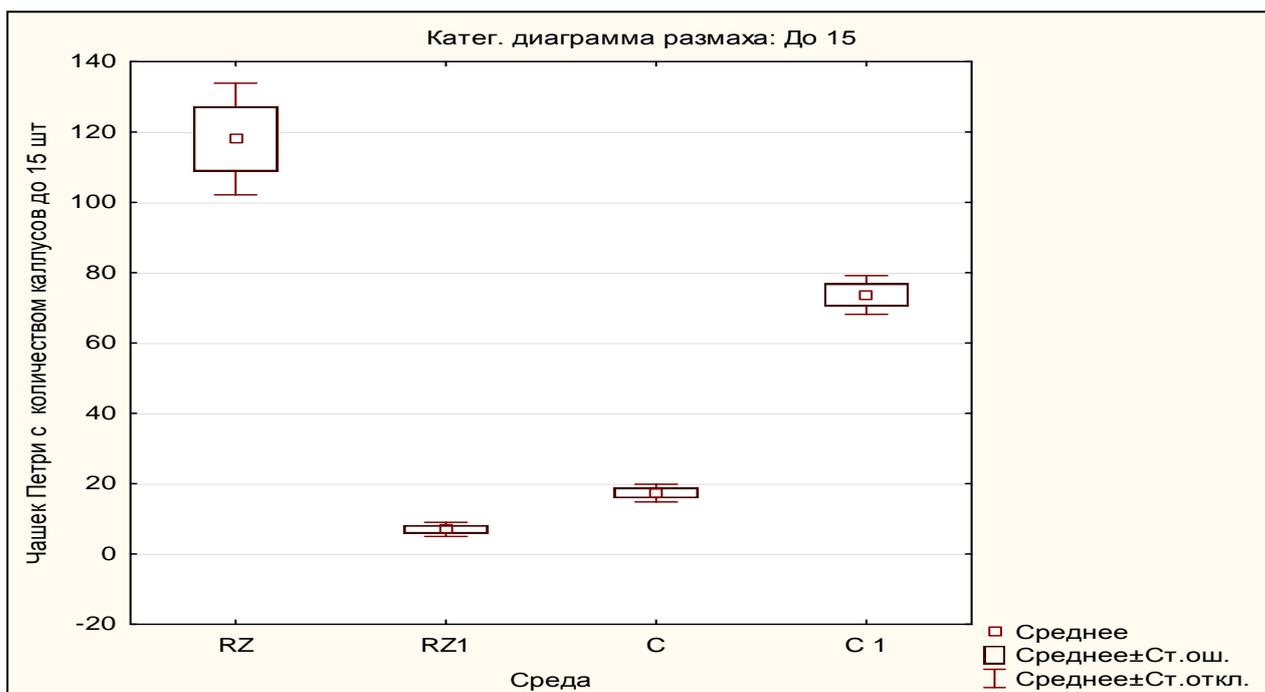


Рис. 2. Выход каллуса на средах RZ, RZ₁, C, C₁ (до 15 штук)

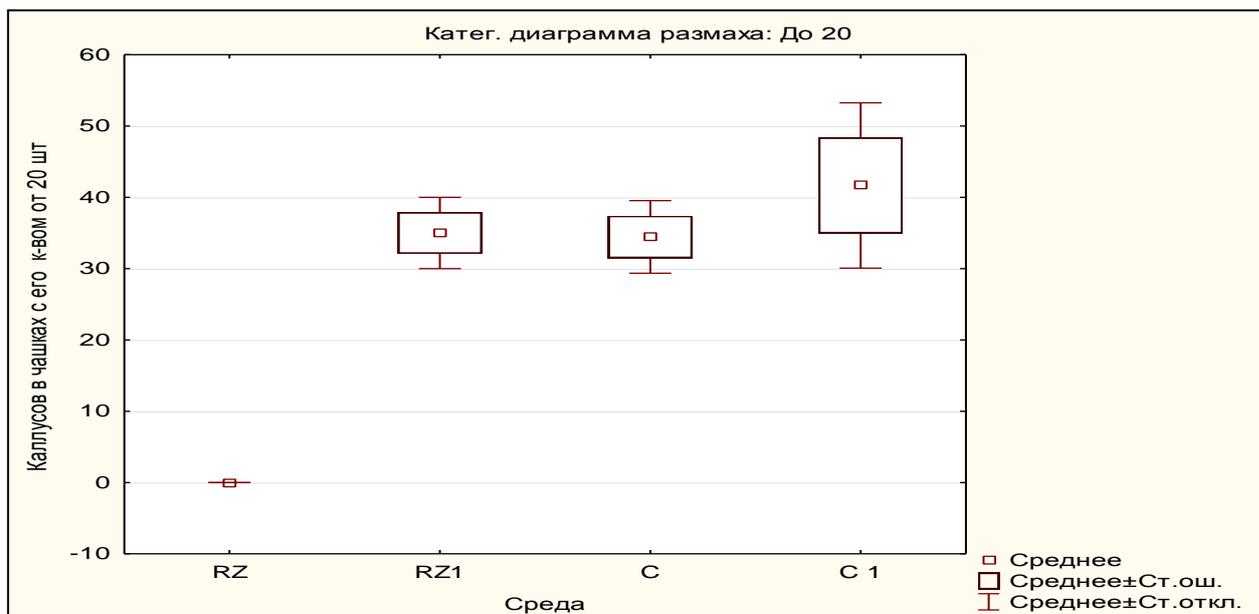


Рис. 3. Выход каллуса на средах RZ, RZ₁, C, C₁ (до 20 штук)

Выводы. Таким образом, среды RZ и RZ₁ достоверно не различались по выходу каллуса, C и C₁ значительно уступали им по данному признаку, однако гормональный состав их различен. Если среда RZ, RZ₁, C₁ содержат индолилуксусная кислота и дихлорфеноксиуксусную кислоты, то среда C – только 2,4 - D.

Среды с повышенным содержанием солей KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, H₃BO₃, CaCl₂·2H₂O, а также высоким содержанием витаминов и регуляторов роста (RZ, RZ₁), обеспечивают более высокий выход каллуса.

Литература

1. Бутенко, Р. Г. Культура изолированных органов и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко.- М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Верещагина, С.А. Выделение гибридных комбинаций с высокой отзывчивостью на культуру пыльников / С.А. Верещагина, Н.Ю. Бушман, Е.А. Малюченко, В.Н. Бруяко // [Электронный ресурс] // Инновационные исследования и разработки для научного обеспечения производства и хранения экологически безопасной сельскохозяйственной и пищевой продукции: матер. Междунар. научн.-практ. конф. (06-26 апр. 2015 г., г. Краснодар). – С. 91-95. URL: http://vniitti.ru/conf/conf2015/sbornik_conf2015.pdf
3. Гончарова, Ю.К. Наследование признака "отзывчивость на культуру пыльников" у риса / Ю.К. Гончарова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2008. - № 2. - С. 40-42.
4. Гончарова, Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса / Ю.К. Гончарова.- Краснодар: ВНИИ риса, 2012. -91 С.
5. Гончарова, Ю.К. Влияние стрессовых факторов на содержание амилозы в образцах риса / Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов, Н.Ю. Бушман, С.А. Ве-

- рещагина // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2013.-№ 5. - С. 45-48.
6. Гончарова, Ю.К. Сравнительный анализ эффективности питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса/ Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов, Н.Ю. Бушман, С.А. Верещагина// Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.- 2013.-№ 6. - С. 6-9.
 7. Гончарова, Ю.К. Способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях патент на изобретение/ Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов // RUS 2465771 13.07.2011
 8. Гончарова, Ю.К. Генетические основы повышения продуктивности риса / Ю.К. Гончарова: дисс.... доктора биологических наук, 2014. - 418с.
 9. Гончарова, Ю. К. Метод закрепления гетерозисного эффекта – реализация на растениях (К столетию со дня рождения В.А. Струнникова) / Ю.К. Гончарова // Онтогенез. - 2014. – Т. 45, № 6. - С.442–446.
 10. Гончарова, Ю.К. Генетические основы повышения продуктивности риса / Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов. - Краснодар: ООО « Просвещение ЮГ», 2015. - 314 с.
 11. Зеленина, Г.А. Морфогенез в культуре *in vitro* сегментов стебля и клональное микроразмножение *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* (Nutt.) Maguire: дисс... канд. биол. наук: 03.00.20 / Зеленина Галина Артемовна. – Одесса, 2006. – 141 с.
 12. Харитонов, Е.М. Стерильность при межподвидовой гибридизации риса *Oryza sativa* L. в связи с поиском генов широкой совместимости и отнесением образцов к подвидам *indica* и *japonica* / Е.М. Харитонов, Ю.К. Гончарова // Сельскохозяйственная биология - 2013. - № 5. - Р. 61-68.
 13. Goncharova, J.K. Molecular markers as the mechanism of fixing genes complex defining heterotic effect / J.K. Goncharova, E.M. Kharitonov // Journal ScienceMED.- 2012. - Vol. 3. – Т. 3. - С. 235-238.
 14. Goncharova, J. K. Rice Tolerance to the Impact of High Temperatures / J. K. Goncharova and E. M. Kharitonov //Agricultural Research Updates.- 2015.- Vol. 9. – Р. 1-37.