

УДК 57.085.23+ 577.21

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-114-121

ОПТИМИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ *IN VITRO* ДЛЯ УСКОРЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕРАЦИЙ РИСА *ORYZA SATIVA* L.

Елена Георгиевна Савенко, Жанна Михайловна Мухина,
Валентина Александровна Глазырина, Людмила Анатольевна Шундрин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр риса», Краснодарский край, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3
E-mail: avena5@rambler.ru

Проведены исследования по изучению отзывчивости генотипов и оптимизации двухэтапной технологии культуры пыльников риса *in vitro* применительно к 8 сортам скрещивания разных по окраске перикарпа и содержанию амилозы в зерновке (5 сортов с окрашенным перикарпом и 3 белозерных сорта российской селекции), увеличения индукции морфогенных каллусов, формирования гаплоидных эмбрионов и растений - регенерантов для селекции сортов нового поколения, предназначенных для функционального питания. Выявлено, что пыльники базальных частей метелки, содержали пыльцу на всех одноядерных стадиях развития, включая раннюю, среднюю и позднюю и показали более высокую частоту индукции каллуса, чем в средней и верхней частях. На ранних стадиях развития микроспор отмечен пылевой диморфизм: присутствие в пыльниках нормальных и эмбриогенных (компетентных) микроспор, которые дают начало новообразованиям в культуре *in vitro*. За счет оптимизации экзогенных факторов удалось стимулировать индукцию каллусов для слабоотзывчивых генотипов. Выявлены оптимальные сроки культивирования новообразованных каллусов на каллусогенных и регенерационных средах для обеспечения максимального выхода регенерантов.

Ключевые слова: *Oryza sativa* L.; культура пыльников *in vitro*; индукционная среда; регенерант; ДН-линии; пирикуляриоз

Введение

Стратегия российской селекции на создание рисопродуктов с высоким качеством крупы, в том числе функционального назначения с содержанием антиоксидантов в зерне – важнейшее направление для получения продуктов здорового питания. Главная функция антиоксидантов в клетке заключается в обезвреживании активных форм кислорода и свободных радикалов, возникающих при действии неблагоприятных экологических факторов. В связи с этим нужен эффективный селекционный алгоритм конвейерного создания и быстрой ротации сортов такого ассортимента на внутреннем рынке страны. Удовлетворить возросшие к темпам селекционного процесса требования возможно применяя селекционные схемы, основанные на комплексном подходе классической селекции и клеточных технологий. Культура пыльников - инновационный метод для ускоренной генерации гомозиготного селекционного материала, который может быть использован в программах создания сортов риса [1-3]. Среди зерновых эффективность метода наиболее высока у риса. В Китае, например, первые сорта риса через культуру пыльников были получены в 1975 г. Уже к 1983 г. было районировано 28 сортов, полученных этим способом. Среди них – сорт 'Wan-keng', занимающий площади 530 000 га [1, 4]. В настоящее время протокол для индукции каллуса и регенерации растений риса *Oryza sativa* L. в культуре пыльников описан и успешно применяется. Однако, зачастую для стимуляции каллусогенеза, индукции морфогенных каллусных линий с последующей регенерацией и ускоренного получения удвоенных гаплоидов (чистых линий) ценных генотипов, вовлеченных в селекционные схемы, необходима оптимизация технологии культивирования изолированных пыльников риса *in vitro* применительно к генетической плазме изучаемых сортообразцов [4]. Успех исследований зависит от

многих факторов. Так, например, эффективность культуры пыльников напрямую зависит от правильного определения степени зрелости пыльников и развития микроспор сортов риса ('Silva' и 'Ратнаяке'). Datta and Wenzel (1998) отмечают, что у риса пыльники с ранней, средней или поздней одноядерной стадией развития микроспор являются наиболее чувствительными и пригодными для культивирования. Трудность культивирования более ранних стадий пыльцы может быть связана с их стремлением дифференцироваться в мужской гаметофит. Реакция пыльников после первого митоза пыльцы резко падает, т.к. начинается осаждение крахмала, но спорофитное развитие не происходит, и впоследствии в микроспорах не образуются макроскопические структуры. Тем не менее, пыльца на этой стадии, после предварительной обработки холодом, может отклоняться от нормальной программы развития и переключаться на спорофитный рост. Следовательно, определение стадии развития пыльцы в пыльниках важно для оптимизации реакции культуры пыльников на конкретный генотип риса. Потенциал пыльников из разных частей метелки индуцировать каллус был исследован Rownak Afza и другими на японском сорте риса 'Тайбэй 309'. Результаты показали, что способность к каллусогенезу пыльников с разных позиций колоска значительно различается. Бишной и др. (2000) сообщили, что расстояние от флагового листа до предпоследней листовой ушной раковины удобный морфологический маркер для оценки стадии зрелости пыльцы у разных сортов риса. Li Wang и др. (2011) изучали влияние сортов и составов сред на индукцию каллуса из пыльников риса и последующую регенерацию растений. Результаты показали, что индукция каллуса существенно не различалась в разных средах, но в основном зависела от генотипов. Лентини и др. (1995) так же сообщают, что среди эндогенных факторов, генотип является основным фактором, влияющим на андрогенный ответ *in vitro* [5-6].

Исследование проводили с целью изучения отзывчивости генотипов и оптимизации двухэтапной технологии культуры пыльников риса применительно к 7 сортам скрещивания разных по окраске перикарпа и содержанию амилозы в зерновке, увеличения индукции морфогенных каллусов, формирования гаплоидных эмбриоидов и растений – регенерантов для селекции сортов нового поколения, предназначенных для функционального питания.

Материалы и методика исследования

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии и молекулярной биологии ФГБНУ «ФНЦ риса» с использованием метода культуры изолированных пыльников (Р.Г. Бутенко 1987). Для определения отзывчивости генотипов скрещивания, оптимизации метода применительно к ним и создания генетически стабилизированных гомозиготных константных дигаплоидных линий (DH) в качестве доноров эксплантов использовали растения сортов с окрашенным перикарпом 'Марс', 'Гагат', 'Южная ночь', 'CRLB-1', 'Red-Хазар' и белозёрных сортов 'Яхонт', 'ВНИИР 6189', 'Хазар'. Растения - доноры для отбора биоматериала (незрелые метелки) выращивали в условиях открытой вегетационной площадки и камерах искусственного климата (КИК). Для определения стадии развития микроспор использовали систему визуализации EVOS XL Core Configured в проходящем свете (светлое поле или фазовый контраст), диапазон объективов 1,25-100x, затем отбор эксплантов (метелок) основывался на морфологических признаках развития растений – доноров. Таким образом, отбор метелок основывался на цитологических наблюдениях, размере и цвете цветка и пыльника. Метелки риса собирали в период за 2-3 дня до выметывания, когда микроспоры находятся на средней и поздней одноядерной стадиях. Метелки риса поверхностно стерилизовали с использованием 4% гипохлорита натрия (NaClO) в течение 15 минут и трижды промывали стерильной водой. Манипуляции с эксплантами

проводились в асептических условиях ламинарного бокса. Для инокуляции пыльников использовали базовую агаризованную питательную среду Блейдса (Blaydes, 1966) с фитогормонами. Пыльники изолировали в стерильных условиях ламинарного бокса и равномерно размещали на поверхности агаризованной питательной среды. Культивировали экспланты в термостате при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности 50,0%, в темноте в течение 3-4 недель после инокуляции. Проводили наблюдение за ответной реакцией пыльников на процессы индукции каллуса с регистрацией данных по каждой отдельной комбинации до образования каллусной массы. Каллусы культивировали на среде Murashige and Scoogy (MS, 1962) при фотопериоде 12 часов – день (5 тыс. люкс), 12 часов – ночь, до появления зеленых проростков, которые для укоренения переносили на безгормональную среду MS. Гаплоидные растения переводили на дигаплоидный уровень с использованием метода зачаточных метелок, при котором метелки размером 0,5-0,7 см вычленили в стерильных условиях бокса и переносили на питательные среды для стимуляции формообразовательных процессов.

Результаты и обсуждение

Исследования проводили на 4-х сортах с окрашенным перикарпом и 3-х белозерных сортах российской селекции (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика сортов риса

№ п/п	Сорт	Содержание амилозы, %	Окраска перикарпа	Форма зерновки
1	'ВНИИР 6189'	25,5	белая	длиннозерный
2	'Яхонт'	17,1	белая	среднезерный
3	'Хазар'	18,1	белая	короткозерный
4	'Марс'	13,5	красная	длиннозерный
5	'Red - Хазар'	16,2	красная	короткозерный
6	'Тагат'	22,0	пурпурная (черная)	длиннозерный
7	'Южная ночь'	15,5	пурпурная	короткозерная

При изучении морфологических характеристик метелок изучаемых генотипов выявлено, что потенциал индукции каллуса пыльников из разных частей метелки существенно отличался. После инокуляции пыльников из базальной, средней и верхней частей процентное соотношение пыльников, образующих каллусы, в среднем составило 21% в базальной, 11% в средней и 7% в верхней части. Связано это с тем, что пыльники базальных частей, содержали пыльцу на всех одноядерных стадиях развития, включая раннюю, среднюю и позднюю, и показали более высокую частоту индукции каллуса, чем у средней и верхней частей. В пыльниках средней части метелки микроспоры в большинстве своем находились на поздней одноядерной и ранней двуядерной стадии развития.

Таким образом, для достижения более высокой эффективности в культуре пыльников риса использовали базальную часть метелки, где длина пыльника составляла менее половины размера цветка, при этом пыльник содержит максимальное количество микроспор на ранней, средней и поздней одноядерной стадии развития (рис. 1).



Рис. 1 Цветки базальной части метелки риса, сорт 'Гагат'

При цитологических исследованиях микроспор изучаемых генотипов отмечена физиологическая разнокачественность пыльцевых зерен (пыльцевой диморфизм), при котором зафиксировано присутствие нормальных и эмбрионных (компетентных) микроспор. Нормальные микроспоры содержали крахмал, интенсивнее окрашивались ацетокармином (вегетативное и генеративное ядра не просматривались). Эмбрионные микроспоры по размеру были меньше нормальных, имели слабое окрашивание цитоплазмы ацетокармином из-за отсутствия у них крахмальных зерен (рис. 2).

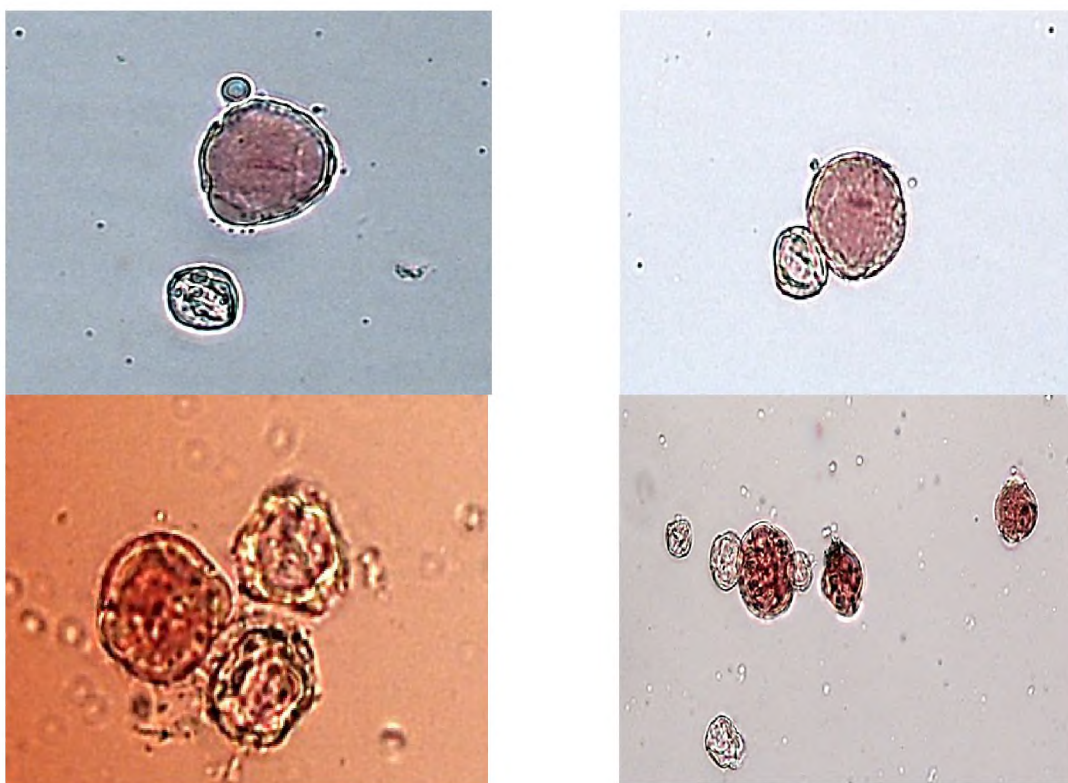


Рис. 2 Пыльцевой диморфизм у риса

Именно в компетентных микроспорах детерминировались процессы развития клеток по пути формирования новообразований, которые давали начало каллусным тканям в культуре *in vitro* изучаемых образцов риса (рис. 3).

Введение пыльников в культуру начинали на среде Блейдса с добавлением 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D). По генотипам изучен морфо-эмбриогенез. В более ранних исследованиях отмечалось, что частота каллусообразования и регенерации зеленых растений значительно меняется в зависимости от генотипа, т.к. разная способность к каллусогенезу и регенерации у риса определяется содержанием и балансом эндогенных гормонов. В связи с этим отмечена разница в индукции каллусных тканей, что проявлялось в количестве пыльников, сформировавших новообразования, в морфологической и структурной разнокачественности каллусов, присутствии в них разных типов тканей. Самый высокий показатель индукции каллусогенеза (4,67%) был получен у сорта 'Хазар'.

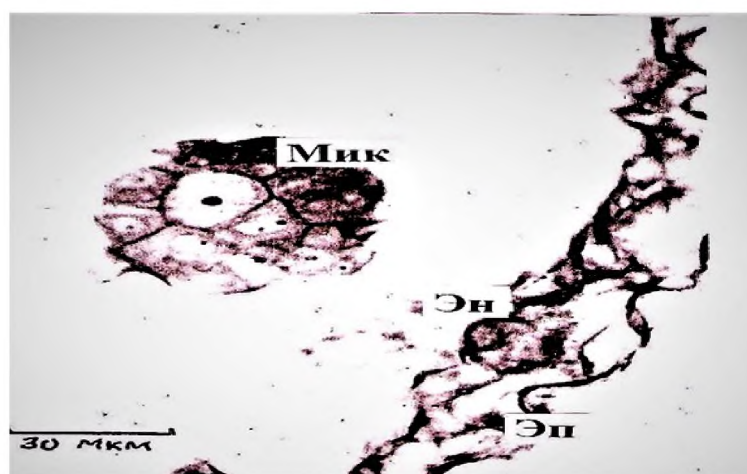


Рис. 3 Образование микрокаллуса из пыльцевого зерна

По комплексу признаков «каллусогенез-регенерация» выделены 3 белозерных сорта, наиболее отзывчивых к технологии культуры пыльников: 'ВНИИР 6189' – 2,21-1,54%, 'Яхонт' – 0,98-1,52%, 'Хазар' – 1,82-4,67% (соответственно каллусогенез-регенерация) (рис. 4).

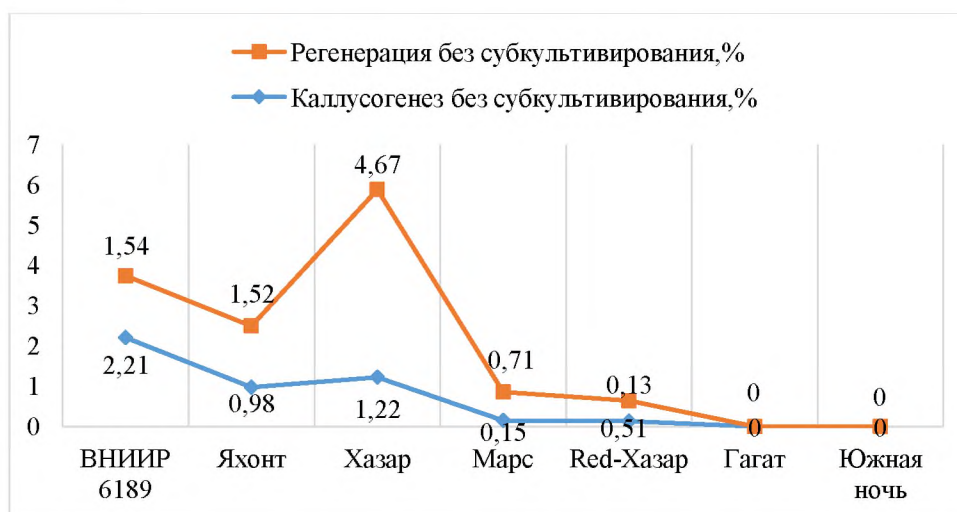


Рис. 4 Каллусогенез и регенерация в культуре пыльников *in vitro* риса (без субкультивирования), %

У окрашенных сортов 'Гагат' и 'Южная ночь' не отмечена индукция каллусов. Низкой отзывчивостью по признаку «каллусогенез» обладали 'Марс', 'Red-Хазар' (рис. 4). Каллусные ткани этих образцов имели низкий морфогенетический потенциал, в результате чего незначительное количество клеток обладали способностью к вторичной дифференцировке с возникновением организованных структур (органов, тканей, эмбриональных комплексов и систем из неорганизованной массы клеток каллуса).

Метод культивирования пыльников риса позволяет реализовать потенциал генотипической отзывчивости исходного материала за счет оптимизации экзогенных факторов индукции андрогенеза. В связи с этим для повышения интенсивности каллусогенеза и формирования морфогенного каллуса, а также с целью спонтанного удвоения хромосом каллусных клеток увеличили период «холодового стресса» для метелок изучаемых генотипов риса с 10-14 до 20-25 дней. Для этих генотипов также использовали прием субкультивирования каллусных тканей. При этом в качестве индукционной среды использовали среду Блейдса, обогащённую 4,0 мг/л 2,4-Д (0-пассаж). Затем каллусы пересаживали на субкультивационную среду Блейдса с пониженной концентрацией 2,4-Д до 2,0 мг/л (1-ый пассаж), продолжительность пассажа составила 20-30 суток.

Благодаря этим приемам у всех образцов отмечено повышение интенсивности индукционного ответа и увеличен выход андрогенных новообразований, в том числе и с потенцией к морфогенезу, т.е. повысилась продуктивность процессов с формированием морфогенного каллуса в 0 – пассаже на повышенных концентрациях фитогормона 2,4-Д (рис. 5).

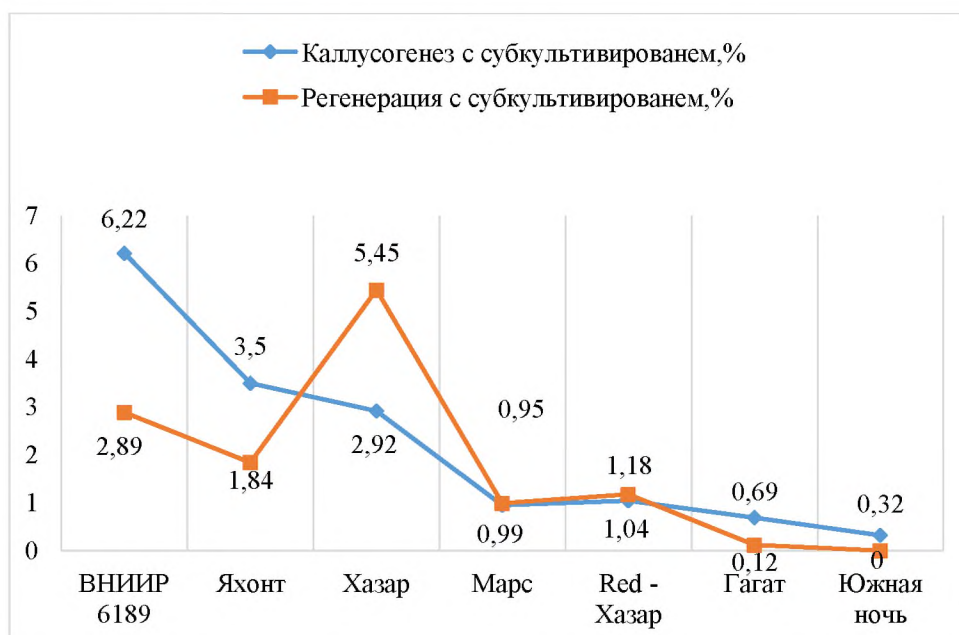


Рис. 5 Каллусогенез и регенерация в культуре пыльников *in vitro* риса (субкультивирование), %

Так, например, у сорта 'ВНИИР 6189' интенсивность каллусогенеза увеличилась в 2,27 раза (6,22% в сравнении с 2,24%), а регенерация в 1,88 раза (2,89% в сравнении с 1,54%); у сорта 'Яхонт' индукция каллусогенеза стала интенсивнее в 3,57 раз (3,50% в сравнении с 0,98%), а регенерация в 1,17 раза (1,84% в сравнении с 1,52%); у сорта 'Хазар' каллусогенез увеличился в 2,39 раза (2,92% в сравнении с 1,22%), а регенерация в 1,17 раз (5,45% в сравнении с 4,67%). Субкультивирование стимулировало индукцию каллусов у сортов 'Гагат' и 'Южная ночь' (0,69 и 0,32 % соответственно). При переносе

калусных тканей, сформированными этими генотипами, на среды с пониженной концентрацией фитогормона 2,4-Д в 1-м пассаже проявилась способность формировать меристемные зоны и/или эмбриональные комплексы у сорта 'Гагат', который без субкультивирования не обладал способностью к регенерации. У сорта 'Южная ночь' стимулирован процесс каллусогенеза, но регенерации растений добиться не удалось.

Самым стабильным в ходе культивирования был сорт 'Хазар', который формировал каллусы с высокой регенерационной способностью (эмбриогенные) – 4,67% без субкультивирования каллусов и 5,45% после субкультивирования каллусов.

Наблюдения за развитием клеток в калусных тканях показали, что степень формирования эмбриогенного каллуса является одним из критических факторов, влияющих на регенерационную способность. Отмечено, что при длительной экспозиции на индукционных питательных средах с ауксинами без пересадки на среды для регенерации клетки эмбрионов/гемм приостанавливали пролиферацию и подвергались дедифференцировке, т.е. прекращалась дифференциация эмбрионального комплекса, клетки которого превращались из клеток с меристемными признаками в паренхимные клетки каллуса. В исследованиях отмечено, что особенно успешно культивирование новообразованных каллусов на каллусогенных средах в течение 20-30 суток и дальнейшее их выращивание в течение 30-45 суток с момента их культивирования на регенерационных средах, что обеспечивает максимальный выход регенерантов. При более длительном культивировании каллусов и в поздних пассажах у всех изученных генотипов морфогенный потенциал снижался за счет некротизации. Снижение морфогенного потенциала в поздних пассажах может быть так же связано с изменением уровня эндогенных гормонов (развивающиеся зародыши-геммы не нуждаются в определенных гормонах ауксинового ряда, так как начинают вырабатывать их сами), накоплением негативных генетических изменений в соматических клетках, их полиплоидизацией, метилированием ДНК, а возможно, и другими, пока не установленными причинами.

Заключение

Как более отзывчивые к технологии культуры пыльников выделены 3 белозерных сорта: 'ВНИИР 6189' – 2,21-1,54%, 'Яхонт' - 0,98-1,52%, 'Хазар' - 1,82-4,67%, соответственно по признакам «каллусогенез-регенерация». Самым стабильным в ходе культивирования был сорт 'Хазар', который формировал каллусы с высокой регенерационной способностью (эмбриогенные) – 4,67% без субкультивирования каллусов и 5,45% после субкультивирования каллусов. Выявлено, что субкультивирование калусных тканей способствует повышению интенсивности индукционного ответа и увеличению выхода андрогенных новообразований, в том числе и с потенцией к морфогенезу. В результате исследований получены экспериментальные данные для оптимизации метода культуры пыльников *in vitro* риса. Лабораторный протокол модифицирован и адаптирован к генетической плазме изучаемых сортообразцов для ускоренной генерации удвоенных гаплоидов (чистых линий) ценных генотипов, вовлеченных в селекционные схемы проекта.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-16-20015 «Инновационная селекционная технология для создания сортов риса с высоким пищевым качеством зерна»

Список литературы

1. Mishra R., Jwala G., Rao N., Rao R.N., Kaushal P. Development and Characterization of Elite Doubled Haploid Lines from Two Indica Rice Hybrids // Rice Science. – 2015. – V. 22. – № 6. – P. 290-299. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2015.07.002>
2. Zhu L., Ya-ping Fu, Wen-zhen Liu, Guo-cheng Hu, Zong-xiu Sun. Rapid Generation of Selectable Marker-Free Transgenic Rice with Three Target Genes by Co-Transformation and Anther Culture // Rice Science. – 2007. – V. 14. – № 4. – P. 239-246.
3. Senadhira D., Zapata-Arias F.J., Gregorio G.B., Alejar M.S., Galvez A.M. Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica/indica anther culture // Field Crops Research. – 2002. – V. 76. – № 2-3. – P. 103-110. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00032](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00032)
4. Yin Jia, Qi-Xiang Zhang, Hui-Tang Pan, Shi-Qin Wang, Ling-Xia Sun. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture // Scientia Horticulturae. – 2014. – V. 17611. – P. 273-281.
5. Rownak Afza, Mei Shen, Francisco Javier Zapata-Arias, Jiahua Xie, Haji Khamis Fundi, Kang-Seop Lee, Eva Bobadilla-Mucino, Andrea Kodym. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency // Plant Science. – 2000. – V. 153. – № 225. – P. 155-159. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00266-6)
6. Wang L., Lin G., Zhao D., Wang F., Chen J. Tissue Culture System for Different Hybrid of Indica Rice // Journal of Northeast Agricultural University (English edition). – 2011. – V. 18. – № 2. – P. 13-17. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60003-8](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60003-8)

Статья поступила в редакцию 20.07.2022 г.

Savenko E.G., Mukhina Zh.M., Glazyrina V.A., Shundrina L.A. Optimization of cellular technologies *in vitro* for accelerated production of rice *Oryza sativa* L. // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 144. – P. 114-121

The research has been carried out to study the responsiveness of genotypes and optimize the two-stage technology of rice anthers culture *in vitro* in relation to 8 cultivars of crossing of different pericarp coloration and amylose content in the grain (5 cultivars with colored pericarp and 3 white-grained cultivars of Russian breeding), increasing the induction of morphogenic calluses, the formation of haploid embryos and regenerating plants for the selection of new generation cultivars intended for functional nutrition. It was revealed that the anthers of the basal parts of the panicle contained pollen at all single-core stages of development, including early, middle and late, and showed a higher frequency of callus induction than in the middle and upper parts. At the early stages of microspore development, pollen dimorphism was noted: the presence of normal and embryogenic (competent) microspores in the anthers, which give rise to neoplasms in *in vitro* culture. Due to the optimization of exogenous factors, it was possible to stimulate the induction of callus for weakly responsive genotypes. The optimal terms of cultivation of newly formed calluses on callus and regeneration media to ensure maximum yield of regenerants have been identified.

Key words: *Oryza sativa* L.; *in vitro* anther culture; induction medium; regenerant; DH-lines; blast