



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1507792** **A1**

(51)4 C 12 N 5/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4353389/31-13
(22) 04.01.88
(46) 15.09.89. Бюл. № 34
(71) Институт физиологии расте-
ний АН УССР
(72) Т.Н.Чеченева, В.А.Труханов
и В.В.Моргун
(53) 578.085.23 (088.8)
(56) Green C., Phillips R. Plant
regeneration from tissue cultures
of maize. - Grop.Science. 1975,
15, № 5, p.417-421.

2

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНИ
КУКУРУЗЫ
(57) Изобретение относится к био-
технологии, в частности к куль-
тивированию тканей растений *in vitro*.
Целью изобретения является повы-
шение индукции каллусообразования и
регенерационной способности. Способ
состоит в том, что перед перенесением
зародышей на модифицированную твердую
питательную среду Мурасиге-Скуга про-
изводится дополнительное инкубиро-
вание их в той же жидкой питательной
среде, в которую в качестве стиму-
лятора каллусообразования вводят 1,4-
дизацетилбутан в количестве 1-
10 мг/л. 2 табл.

Изобретение относится к биотехноло-
гии, в частности к культивированию
тканей растений *in vitro*, а именно к
способам индукции каллусообразования
у злаков, являющейся этапом при реге-
нерации растений путем побегового
морфогенеза и соматического эмбрио-
генеза в культуре ткани злаков и поз-
воляющей получать измененные генотипы
вследствие спонтанной соматической
и индуцированной мутационной изменчи-
вости клеток.

Цель изобретения - повышение ин-
дукции каллусообразования и регене-
рационной способности.

Способ состоит в том, что перед
перенесением зародышей на модифици-

рованную твердую питательную среду
Мурасиге-Скуга (МС) производят допол-
нительное инкубирование их в той же
жидкой питательной среде, в которую
в качестве стимулятора каллусообразо-
вания вводят 1,4-бисдизацетилбутан
(ДАВ) в количестве 1-10 мг/л (ДАВ из-
вестен как мутаген). Проведенные
исследования показали возможность
использования его как стимулятор кал-
лусообразования.

Способ осуществляется следующим об-
разом.

После стерилизации и промывки по-
чатков вычлеченные незрелые зародыши
инкубируют в течение 1 ч в жидкой пита-
тельной среде МС с ДАВ. Затем тща-

РПО-К

(19) **SU** (11) **1507792** **A1**

тельно трижды отмывают жидкой питательной средой. Для хранения вычленившихся зародышей, обработки зародышей ДАБ и отмывки от него используют жидкую питательную среду, но без 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 Д), аминокислот и агара. Обработка расторами ДАБ проводится в чашках Петри при комнатной температуре. Культивируют по два зародыша в пробирках с 10 мл среды при $27 \pm 1^\circ\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде. В качестве стимулятора каллусообразования используют ДАБ в количестве 1-100 мг/л среды. Маточный раствор ДАБ стерилизуют пропусканием через бактерицидный фильтр. Твердая питательная среда для индукции каллуса содержит 0,25 мг/л 2,4 Д.

Пример 1. Незрелые початки линии ВС2923, взятые на критический 16-й день после цветения, поверхностно стерилизуют лабораторным детергентом, трижды промывают стерильной водой. Вычленивают из зерновок незрелые зародыши, удаляют эндосперм. Далее незрелые зародыши переносят на твердую культуральную среду и размещают щитком вверх. Каллус иницируют и сохраняют на модифицированной среде МС, содержащей неорганические компоненты по Мурасиге и Скугу, витамины и аминокислоты по Штраусу, 20 г/л сахарозы, 8 г/л агара. Индукция каллусообразования достигается при использовании в качестве стимулятора роста гербицида 2,4 Д в концентрации 0,25 мг/л. Через 28 дней культивирования проводят учет. Данные представлены в табл.1. Каллусообразование отсутствует, наблюдается лишь прорастание зародышей.

Пример 2. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 1, однако перед посадкой зародышей для культивирования на твердую питательную среду, помещают их на 1 ч в жидкую питательную среду, содержащую 1 мг/л ДАБ. Затем трижды отмывают жидкой питательной средой без ДАБ. При этом наблюдается каллусообразование 24,13%, корнеобразование и прорастание зародышей.

Пример 3. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, однако количество ДАБ составляет 10 мг/л. При этом наблюдается увеличение общего каллусообразования

до $20,68 + 13,79 = 34,47\%$ за счет промежуточной реакции между собственно каллусообразованием и прорастанием: одновременного формирования каллуса и недоразвитого побега. Недоразвитый побег отделяют, а оставшийся каллус можно культивировать дальше.

Пример 4. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, однако количество ДАБ составляет 100 мг/л. Ведущей реакцией является промежуточная реакция, собственно каллусообразование составляет 2,85%, что на порядок меньше, чем в примерах 2 и 3.

Пример 5. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 1, но возраст незрелых зародышей скороспелой линии ВС 2923 составляет 17 дней после опыления. Каллусообразование отсутствует, наблюдается лишь прорастание зародышей.

Пример 6. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, возраст зародышей 17 дней (табл.2). Содержание ДАБ в жидкой питательной среде 1 мг/л. При этом наблюдается появление каллусообразования, промежуточной реакции, корнеобразования. Общая величина каллусообразования $21,72 + 3,12 = 24,84\%$.

Пример 7. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 6, однако количество ДАБ составляет 10 мг/л. Общая величина каллусообразования $13,62 + 6,25 = 19,87\%$.

Пример 8. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 6, однако количество ДАБ составляет 100 мг/л. Общая величина каллусообразования $3,12 + 15,62 = 18,74\%$. Ведущей реакцией зародышей является промежуточная, собственно каллусообразование составило 3,12 %, что значительно меньше, чем в примерах 6 и 7.

Пример 9. Условия проведения опыта соответствуют описанным в примере 1, но возраст незрелых зародышей скороспелой линии ВС 2923 составляет 18 дней после опыления. Каллусообразование отсутствует, наблюдается лишь прорастание зародышей.

Пример 10. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, возраст зародышей 18 дней, содержание ДАБ в жидкой питательной среде 1 мг/л. При этом наблюдается появление

каллусообразования промежуточной реакции, корнеобразования. Общая величина каллусообразования $18,75 + 6,25 = 25\%$.

Пример 11. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, возраст зародышей 18 дней, содержание ДАБ 10 мг/л. Общая величина каллусообразования $15,62 + 12,50 = 28,12\%$.

Пример 12. Условия проведения опыта аналогичны описанным в примере 2, возраст зародышей 18 дней, содержание ДАБ 100 мг/л. Общая величина каллусообразования $3,12 + 9,37 = 12,49\%$. Ведущей реакцией зародышей является промежуточная, собственно каллусообразование 3,12%, что значительно меньше, чем в примерах 10 и 11.

Таким образом обработка незрелых зародышей скороспелой линии ВС 2923 ДАБ в количестве 1; 10 и 100 мг/л расширяет спектр ростовых реакций незрелых зародышей критического для данной линии 16-дневного и старшего возраста и обеспечивает возможность получения каллуса еще в течение 2-3 дней. Кроме наблюдаемых в контроле прорастания и прекращения развития зародышей в вариантах с обработкой ДАБ отмечены каллусообразование, промежуточная реакция (формирование одновременно каллуса и недоразвитого побега), интенсивное корнеобразование. Каллус индуцируется двух типов: рыхлый, светло-желтый с участками позеленения, из которого в дальнейшем возможна регенерация растений, т.е. тотипотентный и плотный компактный белый. Образование тотипотентного морфогенного каллуса чаще наблюдается при содержании ДАБ 1 - 10 мг/л.

При содержании ДАБ 100 мг/л преобладает образование неморфогенного

белого плотного каллуса, полученного в основном от зародышей, для которых характерна промежуточная реакция между собственно каллусообразованием и прорастанием.

Таким образом, предлагаемый способ индукции каллусообразования из незрелых зародышей кукурузы, включающий обработку зародышей перед культивированием мутагеном ДАБ в количестве 1-10 мг/л более эффективен по сравнению с известным, так как позволяет увеличить в два раза временной промежуток для введения в культуру незрелых зародышей кукурузы, обеспечивает при этом изменение спектра ростовых реакций зародышей определенного возраста и получение тотипотентного каллуса, что позволяет повысить эффективность селекционной работы на клеточном уровне.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ культивирования ткани кукурузы, включающий вычленение зародышей из простерилизованного початка, перенесение их на модифицированную твердую питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую в качестве стимулятора каллусообразования 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту, и дальнейшее их культивирование, отличающийся тем, что, с целью повышения индукции каллусообразования и регенерационной способности, перед нанесением зародышей на твердую питательную среду производят дополнительное инкубирование их в той же жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга, в которую в качестве стимулятора каллусообразования вводят 1,4-диазоцетилбутан в количестве 1-10 мг/л.

Т а б л и ц а 1

Ростовые реакции незрелых зародышей кукурузы после обработки ДАБ

Пример, №	ДАБ мг/л	2,4Д, мг/л	Возраст зародышей, день	Ростовая реакция зародышей, %				
				Каллус	Каллус + недоразвитый побег	Прорастание	Корне- образо- вание	Разви- тия нет
1	0	0,25	16	-	-	53,12	-	46,87
2	1	0,25	16	24,13	-	41,37	10,34	24,13
3	10	0,25	16	20,68	13,79	34,48	-	31,03
4	100	0,25	16	2,85	23,71	42,85	2,85	25,71
5	0	0,25	17	-	-	59,38	-	40,52
6	1	0,25	17	21,72	3,12	31,25	12,50	31,25
7	10	0,25	17	15,62	6,25	25,00	6,25	46,87
8	100	0,25	17	3,12	15,62	25,00	-	56,25
9	0	0,25	18	-	-	62,50	-	37,50
10	1	0,25	18	18,75	6,25	34,37	3,12	37,51
11	10	0,25	18	15,02	12,50	37,51	6,25	28,42
12	100	0,25	18	3,12	9,37	40,36	12,50	34,66

Т а б л и ц а 2

Влияние возраста незрелых зародышей линии ВС2923 на
индукцию каллусообразования

Данные об изолированных зародышах		Каллусообразование, %			
Возраст, дни	Длина, мм	Количество 2,4 Д (мг/л)			
		2,0	1,0	0,5	0,25
14	1,0 - 1,2	15,62	40,6	38,12	9,36
15	1,0 - 1,5	31,81	50,00	18,18	9,09
16	1,5 - 2,0	32,14	46,15	11,53	-
17	2,0 - 2,5	10,71	-	-	-
18	2,5 - 3,0	-	-	-	-

Составитель В. Демкин

Редактор Л. Пчолинская

Техред М. Моргентал

Корректор С. Шекмар

Заказ 5516/29

Тираж 501

Подписное

ВНИИИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101