

УДК 633.18:631.527.8:581.143.6

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД  
ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ РИСА ИЗ КАЛЛУСА  
В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO***

М.В. ИЛЮШКО

(ФГБНУ «Приморский НИИСХ»)

*В культуре пыльников in vitro исследователи больше уделяют внимание индукционным питательным средам для получения каллуса. Подбор регенерационных питательных сред также важная часть процесса получения регенерантов в условиях in vitro. Приводятся данные по регенерации растений из каллуса риса *Oryza sativa* L. трех сортов и трех гибридов  $F_2$ , полученного в культуре пыльников in vitro на двух вариантах регенерационных питательных сред ( $MS$  и  $N_6$ ) с одинаковым гормональным составом (1,0 мг/л кинетин и 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина), но различающихся органоминеральной основой и источником углеводов: 30,0 г/л мальтозы в среде  $MS$  и 60,0 г/л сахарозы в среде  $N_6$ . На среде  $MS$  гибридных каллусов с зелеными регенерантами было 14,3–45,5%, каллусов, полученных из сортов, с зелеными регенерантами 0–15,4%. На среде  $N_6$  процент таких каллусов составил 31,0–40,0% и 9,1–30,0% соответственно, т.е. частота встречаемости каллусных агрегатов с зелеными регенерантами на среде  $N_6$  была в основном в 2–3 раза выше, чем на среде  $MS$ . На среде  $N_6$  сформировалось от 2,64 до 3,50 регенерантов на каллус у гибридов и от 6,17 до 18,33 регенерантов на каллус у сортов, что достоверно превышает данный показатель на среде  $MS$  на 5%-ном уровне значимости. На среде  $MS$  регенерация колебалась от 0,33 до 1,00 на каллусе, полученном из гибридов, и от 0 до 1,23 на каллусе, полученном из сортов. Питательную среду  $N_6$  можно использовать как эффективную для регенерации растений из каллуса, полученного в культуре пыльников дальневосточных сортов и гибридов риса in vitro.*

**Ключевые слова:** рис, *Oryza sativa* L., культура пыльников in vitro, регенерационная питательная среда, регенерант.

Культура пыльников риса in vitro широко применяется в селекции риса во всем мире, поскольку позволяет получить гомозиготные линии в течение одного поколения, что сокращает селекционный процесс на четыре-пять лет [4, 5, 14, 15]. Использование этого метода дало положительные результаты и в Российской Федерации [12], в том числе на российском Дальнем Востоке. Так, в 90-е годы прошлого

столетия и в 2006 г. получены соматклоны и гаметоклоны дальневосточных сортов и гибридов риса в Биолого-почвенном институте ДВО РАН [6, 7]. Но работа до логического конца не была доведена, поэтому в настоящее время в Государственном реестре селекционных достижений РФ по 12 зоне отсутствуют сорта риса, полученные с помощью методов биотехнологии ([www.gossort.com](http://www.gossort.com)).

Технология получения регенерантов растений в культуре пыльников *in vitro* — это многоступенчатый процесс. Вначале получают каллусную культуру из незрелых микроспор. Затем в этой культуре индуцируют вторичную дифференцировку и регенерируют растения [1, 2, 10, 14]. Для дифференцировки каллуса риса, в подавляющем большинстве случаев, применяют питательные среды по прописи Т. Murashige and F. Skoog (MS) [17], которые варьируются по гормональному составу. В обзорной работе Ю.К. Гончаровой по культуре пыльников риса [3] для этой цели так же приводится регенерационная среда MS. Различные авторы рекомендуют использовать в качестве углеводов сахарозу или мальтозу от 3 до 6% [3, 6]. Стоит отметить, что исследователи больше обращают внимание на подбор индукционных питательных сред, чем на изучение регенерационных сред, хотя некоторые из них отмечают, что это наиболее трудный этап [3].

В предыдущие годы нами были подобраны питательные среды для индукции каллусообразования в культуре пыльников *in vitro* дальневосточных сортов и гибридов риса [9]. Целью данных исследований является подбор регенерационной питательной среды для гибридов и сортов селекции Приморского НИИСХ.

### Материал и методика исследования

Для сравнительной оценки составов питательных сред для регенерации из каллуса в культуру *in vitro* введены пыльники трех сортов риса *Oryza sativa* L. подвида *japonica* Kato селекции Приморского НИИСХ: Луговой, Долинный, Каскад; и трех гибридов второго поколения этого подвида риса, полученных в лаборатории селекции риса Приморского НИИСХ: 2–1 (Новатор × (Приозерный × (Дальневосточный × Науакэзе)); 7–1 (Хазар × Дарий 23); 13–3 (Луговой × Вираз). Родительскими формами являлись сорта отечественной, в том числе дальневосточной, и японской селекции.

Растения-доноры выращивали на вегетационной площадке лаборатории селекции риса до периода сбора метелок.

Холодовая обработка и выделение пыльников проведены согласно методике М.В. Илюшко [8, 16] при температуре 5°C в течение 7 дней.

Получение регенерантов проводилось в два этапа. На первом этапе в культуре пыльников индуцировали пролиферацию каллуса на питательной среде N<sub>6</sub> [13], содержащую 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, в темноте при температуре 25–27°C до образования каллуса размером 2–5 мм. Второй этап заключался непосредственно в получении растений-регенерантов. Для дифференцировки каллусы пересаживали на регенерационные среды N<sub>6</sub>-рк (N<sub>6</sub> — среда С. Chu [13]), и MS-рк (MS — среда Т. Murashige and F. Skoog [17]), их составы приведены в таблице 1.

Каллусы помещали в культурульную комнату со следующими условиями: освещенность 4 тыс. лк, температура 22–25°C, фотопериод 16/8 часов. Статистическая оценка (средние значения признака и стандартное отклонение) проводилась с ис-

пользование программы Statistica, для подтверждения различий между средними использован  $\chi$ -критерий Ван-дер-Вардена [11].

Т а б л и ц а 1

**Состав питательных сред для регенерации из каллуса**

Компонент, мг/л	N <sub>6</sub> -рк	MS-рк
Макросоли	N <sub>6</sub> *	MS**
Микросоли	N <sub>6</sub>	MS
Железо-хелат	N <sub>6</sub>	MS
Тиамин HCl — B <sub>1</sub>	1,0	0,4
Пиридоксин HCl — B <sub>6</sub>	0,5	0,5
Никотиновая кислота — PP	0,5	0,5
Глицин	2,0	2,0
Мезо-инозитол	—	100,0
Казеин гидролизат	—	500,0
L-глутамин	—	500,0
БАП	1,0	1,0
Кинетин	1,0	1,0
Сахароза, г/л	60,0	—
Мальтоза, г/л	—	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0
pH	5,8	5,8

*Примечание.* N<sub>6</sub>\* — среда по прописи С. Chu [13], MS\*\* — среда по прописи Т. Murashige and F. Skoog [17].

## Результаты

Число каллусных агрегатов, способных к регенерации, различалось на изучаемых средах. На среде MS-рк гибридных каллусов с зелеными регенерантами было 14,3–45,5%, каллусов, полученных из сортов, с зелеными регенерантами 0–15,4%. На среде N<sub>6</sub>-рк процент таких каллусов составил 31,0–40,0% и 9,1–30,0% соответственно, т.е. частота встречаемости каллусных агрегатов с зелеными регенерантами на среде N<sub>6</sub>-рк была в 2–3 раза выше, чем на среде MS-рк. На обоих вариантах

сред каллусные агрегаты гибридов и сортов риса большинстве случаев не образовали вовсе регенерантов, либо они были альбиносами.

Число высаженных каллусных агрегатов на каждый вариант питательной среды и среднее число регенерантов на каллус приведены в таблицах 2 и 3. Из данных этих таблиц следует, что регенерация на среде N<sub>6</sub>-рк превышает регенерацию на среде MS-рк в несколько раз по числу сформированных регенерантов на каллус. Разница между средними значениями признака во всех случаях статистически достоверна, поскольку фактическое значение X-критерия больше, чем статистическое для 5%-ного уровня значимости.

Т а б л и ц а 2

**Частота образования зеленых регенерантов на вариантах питательных сред, полученных из каллуса гибридных пыльников**

Гибрид	MS-рк			N <sub>6</sub> -рк			X <sub>м</sub>	X <sub>ф</sub>
	число каллусов	среднее число зеленых побегов на каллус	S <sub>x</sub>	число каллусов	среднее число зеленых побегов на каллус	S <sub>x</sub>		
2-1	6	0,33	0,52	11	2,64	4,84	3,36	3,70
7-1	7	0,86	2,27	12	3,50	4,66	3,61	4,95
13-3	11	1,00	1,27	16	3,43	6,17	4,51	4,91

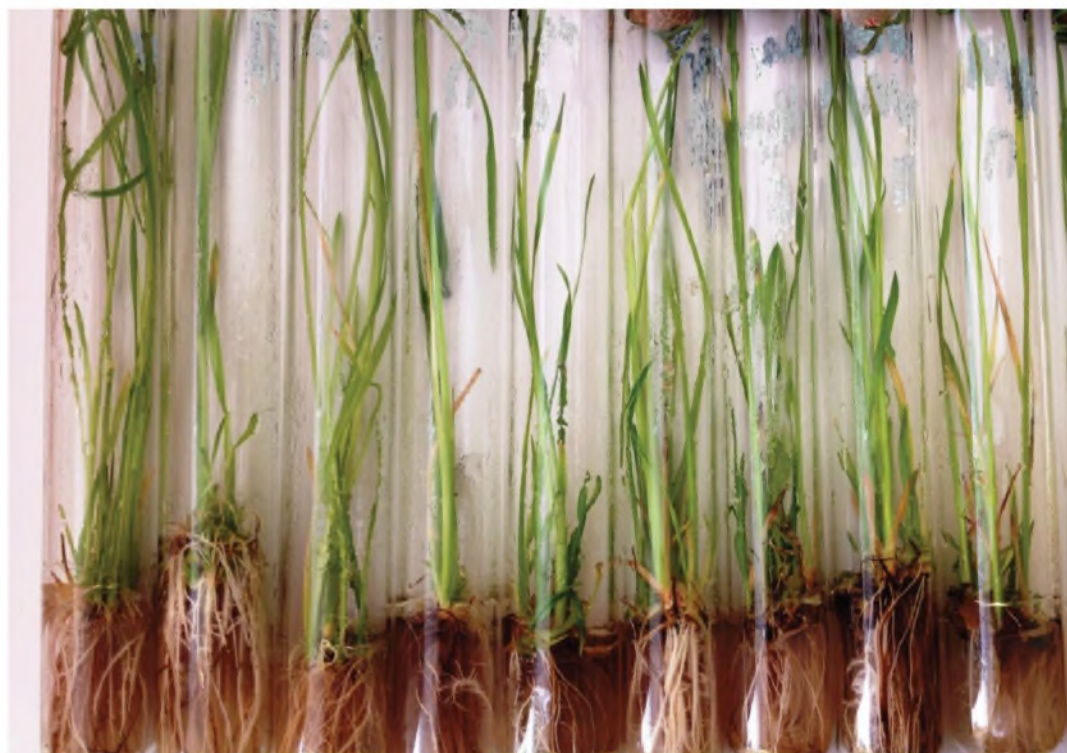
*Примечание.* В таблицах 2, 3: S<sub>x</sub> — стандартное отклонение среднего значения признака; X<sub>м</sub> и X<sub>ф</sub> — теоретическое и фактическое значения критерия Ван-дер-Вардена, соответственно.

Т а б л и ц а 3

**Частота образования зеленых регенерантов на вариантах питательных сред, полученных из каллуса дальневосточных сортов**

Сорт	MS-рк			N <sub>6</sub> -рк			X <sub>м</sub>	X <sub>ф</sub>
	число каллусов	среднее число зеленых побегов на каллус	S <sub>x</sub>	число каллусов	среднее число зеленых побегов на каллус	S <sub>x</sub>		
Луговой	7	0,00	0,00	12	18,33	27,75	3,61	6,38
Каскад	13	1,23	3,00	18	6,17	19,62	4,91	8,53
Долинный	14	0,00	0,00	11	7,00	23,22	4,36	9,03

В 2013–2014 гг. нами были введены в культуру *in vitro* пыльники 19 гибридов и трех сортов риса, которые образовали каллус на среде N<sub>6</sub>-рк, 17 из них обладали регенерационной способностью (рис.). В отдельных случаях каллусные агрегаты инициировали десятки регенерантов.



**Рис.** Регенеранты, полученные на среде  $N_6$ -рк в культуре пыльников *in vitro* дальневосточных сортов и гибридов риса *Oryza sativa* L.

Таким образом, среду  $N_6$ -рк можно использовать как эффективную для регенерации растений из каллуса, полученного в культуре пыльников дальневосточных сортов и гибридов риса *in vitro*.

### ***Благодарности***

*Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории селекции риса Приморского НИИСХ и лично руководителю лабораторией М.В. Анищенко за предоставленные семена риса и всестороннюю помощь.*

*Работа частично поддержана грантом «Программа фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» № 15-1-6-005.*

### **Библиографический список**

1. *Бабикова А.В.* Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабикова, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев // Комаровские чтения. 2007. Вып. LV. С. 184–211.
2. *Батыгина Т.Б.* От микроспоры к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова [и др.]. М.: Наука, 2010. 174 с.
3. *Гончарова Ю.К.* Использование культуры пыльников в селекции риса/ Ю.К. Гончарова. Краснодар, 2007. 56 с.

4. Гончарова, Ю.К. Использование культуры пыльников в селекции риса в Китае. Обзор / Ю.К. Гончарова // Рисоводство. 2005. № 7. С. 8–12.
5. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса / Ю.К. Гончарова. Краснодар: ВНИИ риса, 2012. 91 с.
6. Журавлев Ю.Н. Отчет по гранту ДВО РАН за 2006 г. «Методы биотехнологии в селекции сои и риса» / Ю.Н. Журавлев. Владивосток, 2006. 9 с.
7. Змеева В.Н. Использование методов биотехнологии в селекции риса в Приморском крае / В.Н. Змеева, Ю.Н. Журавлев // Научное обеспечение АПК Дальнего Востока: материалы научной сессии (Уссурийск, 18–20 августа 1993 г.). Новосибирск, 1995. С. 132–136.
8. Илюшко М.В. Применение феноксиуксусной кислоты в культуре пыльников риса *in vitro* / М.В. Илюшко // Вестник КрасГАУ. 2014. № 6. С. 143–148.
9. Илюшко М.В. Эффективность питательных сред при получении регенерантов в культуре пыльников риса *in vitro* / М.В. Илюшко // Вестник российской сельскохозяйственной науки, 2015, № 4. С. 60–61.
10. Круглова Н.Н. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова [и др.]. М.: Наука, 2005. 99 с.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. М.: Высш. Школа, 1980. 293 с.
12. Пат. 2465771. RU A01K 67/00. Способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях / Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов; патентообладатель ГНУ ВНИИ риса. № 2011128792/10; заявл. 13.07.11; опубл. 10.11.12, Бюл. 31. 11 с.
13. Chu C. The N<sub>6</sub> medium and its applications to anther culture of cereal crops / C. Chu // Plant Tissue Culture. 1978. P. 43–50.
14. Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement / S.K. Datta // Current Science. 2005. Vol. 10. P. 1870–1878.
15. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J.M. Dunwell // Plant Biotechnology Journal. 2010. Vol. 8. P. 377–424.
16. Ilyushko M.V. The effect of auxin on plant regeneration on rice from anther culture *in vitro* / M.V. Ilyushko // Science Time. 2014. № 10. P. 160–167.
17. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF NUTRIENT MEDIA FOR PLANT RAGENERATION FROM RICE CALLUS IN ANTHHER CULTURE *IN VITRO*

M.V. ILYUSHKO

(FSBSI «Primorsky Scientific Research Institute of Agriculture»)

*In the anther in vitro culture, researchers typically pay more attention to inductive nutrient media for callus production. The selection of a regenerative nutrient medium is also an important part of the process of obtaining regenerants in in vitro conditions. The paper describes data on plant regeneration from callus of three varieties and three hybrids F<sub>2</sub> of Oryza sativa L. rice. Calluses were initiated on N<sub>6</sub> medium (2,0 mg/l 2,4-dichlorphenoxyacetic acid) and transplanted in two media- MS-r and N<sub>6</sub>-r — both having equal hormonal composition (1,0 mg/l kinetin and 1,0 mg/l of 6-benzylaminopurine), different organomineral bases and carbohydrate sources (3% maltose in MS-r medium and 6% sucrose in N<sub>6</sub>-r medium). Green regenerants were formed on 14,3–45,5%*

hybrids' calluses and 0–15,4% varieties' calluses in MS-r medium. In  $N_6$ -r medium green regenerants accounted for 31,0–40,0% and 9,1–30,0% calluses, accordingly. This clearly manifested that the number of calluses with green regenerants were formed 2–3 times more frequently in  $N_6$ -r medium in, than in MS-r medium. Plant regeneration proved to be significantly higher in  $N_6$ -r medium: from 2,64 to 3,50 green regenerants on hybrids' callus and from 6,17 to 18,33 green regenerants on varieties' callus, which definitely exceeds this indicator on MS-r medium at a 5% significance level. In MS-r medium regeneration varied from 0,33 to 1,00 on hybrids' callus and from 0 to 1,23 on varieties' callus. The author recommends nutrient medium  $N_6$ -r for plant regeneration from callus derived in anther culture in vitro of Far Eastern rice cultivars and hybrids.

**Key words:** rice, *Oryza sativa* L., anther culture in vitro, nutrient medium for regeneration, regenerant.

## References

1. Babikova A.V. Rasteniye kak ob"yekt biotekhnologii [Plant as an object of biotechnology] / A.V. Babikova, T.Yu. Gorpenchenko, Yu.N. Zhuravlev // Komarovskiy chteniye. 2007. Issue LV. P. 184–211.
2. Batygina T.B. Ot mikrospory k sortu [From microspores to varieties] / T.B. Batygina, N.N. Kruglova, V.Yu. Gorbunova [i dr.]. M.: Nauka, 2010. 174 p.
3. Goncharova Yu.K. Ispol'zovaniye kul'tury pyl'nikov v selektsii risa [The use of anther culture in rice breeding] / Yu.K. Goncharova. Krasnodar, 2007. 56 p.
4. Goncharova Yu.K. Ispol'zovaniye kul'tury pyl'nikov v selektsii risa v Kitaye. Obzor [The use of anther culture in rice breeding in China. Review] / Yu.K. Goncharova // Risovodstvo. 2005. No. 7. P. 8–12.
5. Goncharova Yu.K. Ispol'zovaniye metoda kul'tury pyl'nikov v selektsii risa [Using the method of anther culture in rice breeding] / Yu.K. Goncharova. Krasnodar: VNII risa, 2012. 91 p.
6. Zhuravlev Yu.N. Otchet po grantu DVO RAN za 2006 g. "Metody biotekhnologii v selektsii soi i risa" [Report on the grant of the FEB RAS for 2006 "Methods of biotechnology in the selection of soy and rice"] / Yu.N. Zhuravlev. Vladivostok, 2006. 9 p.
7. Zmeyeva V.N. Ispol'zovaniye metodov biotekhnologii v selektsii risa v Primorskom kraye [The use of biotechnology methods in rice breeding in the Primorsky Krai] / V.N. Zmeyeva, Yu.N. Zhuravlev // Nauchnoye obespecheniye APK Dal'nego Vostoka: materialy nauchnoy sessii (Ussuriysk, 18–20 avgusta 1993g.). Novosibirsk, 1995. P. 132–136.
8. Ilyushko M.V. Primeneniye fenoksiusksusnoy kisloty v kul'ture pyl'nikov risa in vitro [The use of phenoxyacetic acid in rice anther culture in vitro] / M.V. Ilyushko // Vestnik KrasGAU. 2014. No.6. P. 143–148.
9. Ilyushko M.V. Effektivnost' pitatel'nykh sred pri poluchenii regenerantov v kul'ture pyl'nikov risa in vitro [The efficacy of nutrient media in the production of regenerants in anther culture in vitro] / M.V. Ilyushko // Vestnik rossiyskoy sel'skokhozyaystvennoy nauki, 2015, No.4. P. 60–61.
10. Kruglova N.N. Embriologicheskiye osnovy androklonii pshenitsy [Embryological bases of wheat androclinium] / N.N. Kruglova, T.B. Batygina, V.Yu. Gorbunova [i dr.]. M.: Nauka, 2005. 99 p.
11. Lakin G.F. Biometriya [Biometrics]. / G.F. Lakin. M.: Vyssh. Shkola, 1980. 293 p.
12. Pat. 2465771. RU A01K 67/00. Sposob zakrepleniya geterozisa gibridov v posleduyushchikh pokoleniyakh [The method of fixing the heterosis of hybrids in subsequent generations] / Yu.K. Goncharova, Ye.M. Kharitonov; patent owner GNU VNII risa. No.2011128792/10; applied on 13.07.11; published on 10.11.12, Bul. 31. 11 p.
13. Chu C. The  $N_6$  medium and its applications to anther culture of cereal crops / C. Chu // Plant Tissue Culture. 1978. P. 43–50.

14. *Datta S.K.* Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement / S.K. Datta // *Current Science*. 2005. Vol. 10. P. 1870–1878.
15. *Dunwell J.M.* Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J.M. Dunwell // *Plant Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 8. P. 377–424.
16. *Ilyushko M.V.* The effect of auxin on plant regeneration on rice from anther culture in vitro / M.V. Ilyushko // *Science Time*. 2014. No. 10. P. 160–167.
17. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

**Илюшко Марина Владиславовна** — к. б. н, доц., ст. науч. сотр. лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФГБНУ «Приморский НИИСХ» (692539, Приморский к., Уссурийский ГО, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, д. 30; тел.: (950) 284-09-83; e-mail: [ilyushkoiris@mail.ru](mailto:ilyushkoiris@mail.ru)).

**Marina V. Ilyushko** — PhD (Bio), Associate Professor, senior research engineer of the Laboratory of Agricultural Biotechnology, FSBSI «Primorsky Scientific Research Institute of Agriculture» (692539, Primorsky krai, Ussuriysk, Timiryazevskiy settlement, Volozhenina str., 30; 89502840983; e-mail: [ilyushkoiris@mail.ru](mailto:ilyushkoiris@mail.ru)).