

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОЙ ОБРАБОТКИ НА КУЛЬТУРУ ПЫЛЬНИКОВ ГИБРИДОВ РИСА *IN VITRO*^{*}

Изучено влияние двух режимов холодовой обработки пыльников (5°C и 10°C в течение семи дней) для культуры *in vitro* дальневосточных гибридов риса *Oryza sativa L.* подвида *japonica*. Каллусообразование оказалось одинаковым при обоих режимах. Обработка пыльников температурой 5°C значительно эффективнее за счет более высокого выхода зеленых побегов на каллус ($t=2,45$; $p=0,04$) и меньшего альбинизма ($t=2,69$; $p=0,02$).

Ключевые слова: рис, культура пыльников, *in vitro*, холодовая обработка, регенерант.

M.V. Il'yushko

THE INFLUENCE OF THE LOW-TEMPERATURE TREATMENT ON THE ANTER CULTURE OF THE RICE HYBRIDS *IN VITRO*

The influence of two modes of the antherlow-temperature treatment (5°C and 10°C for seven days) for culture *in vitro* of the far eastern hybrids of rice *Oryza sativa L.* subspecies *japonica* is studied. The tylosis formation appeared to be identical in both modes. The treatment of anthers by the 5°C temperature is much more effective due to the higher outcome of green sprouts on tylosis ($t=2,45$; $p=0,04$) and loweralbinism ($t=2,69$; $p=0,02$).

Key words: rice, anther culture, *in vitro*, low-temperature treatment, regenerant.

Введение. Рис – уникальная культура для юга Дальнего Востока. Возделывать ее возможно на ограниченных территориях нашей страны в связи с ее теплолюбивостью. Приморье с давних пор использует свое преимущество. В связи с этим обязательна селекционная работа. Направления селекции по этой культуре для получения высоких стабильных урожаев в Приморском крае четко обозначены исследователями [1, 2].

Культура пыльников широко используется в селекционных программах риса во всем мире [3–7] и в нашей стране, позволяя сократить селекционный процесс на 5–6 лет [8]. Методы биотехнологии используются для создания исходного селекционного материала в Приморском крае почти 30 лет [1, 9, 10]. К сожалению, в Государственном реестре селекционных достижений РФ по 12-й зоне пока отсутствуют «биотехнологические» сорта риса [11, www.gossort.com].

В Приморском НИИСХ впервые начаты исследования по созданию исходного материала для селекции риса методом культуры пыльников *in vitro*. Методики получения регенерантов риса андроклинического происхождения отражены в ряде работ [8]. Однако любое начинание требует отработки методики и оптимизации условий для применяемых генотипов. Критическими в получении регенерантов риса в культуре пыльников являются ряд факторов: генотип исходных растений, условия выращивания исходных растений, состав индукционных питательных сред, температура предобработки пыльников и др. [5–8].

Изучение влияния последнего фактора стало предметом данного исследования. Известно, что холодовая обработка пыльников значительно увеличивает как индукцию каллусов, так и выход зеленых растений у риса [12]. Для сортов риса подвида *japonica* наиболее эффективна температура 5°C в течение семи дней [12]. Дальневосточные исследователи рекомендуют температуру $8\text{--}12^{\circ}\text{C}$ в течение 7–12 дней [9, 13].

Цель исследования. Подобрать эффективный режим холодовой обработки пыльников дальневосточных гибридов риса, используемых в селекционном процессе, для культуры *in vitro*.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовано потомство четырех гибридов второго поколения риса посевного *Oryza sativa L.* подвида *japonica*. Родительскими формами являлись сорта отечественной, в том числе дальневосточной, и японской селекции: 1-2 ((Рассвет x Новатор) x Новатор); 2-1 (Новатор x (Приозерный x (Дальневосточный x Hayakaze))); 7-1 (Хазар x Дарий 23); 13-3 (Луговой x Вираж).

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

Холодовая обработка и выделение пыльников проводились согласно методике, опубликованной в работах М.В. Илюшко [14, 15]. Режим обработки пыльников 5 и 10°C в течение семи дней.

Получение регенерантов проводилось в два этапа. На первом этапе в культуре пыльников индуцировали пролиферацию каллуса. Для этого использованы восемь вариантов индукционных сред, состав которых представлен в таблице 1. Второй этап заключался непосредственно в получении растений-регенерантов, для чего каллусы пересаживали на регенерационную среду N_6 , состав среды и условия культивирования пыльников и каллусов приведены в работах [14, 15].

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

Для укоренения регенерантов использована среда T. Murashige, F.Skoog [17] с половинным минеральным составом макросолей, в вариации, приведенной Ю.К. Гончаровой [12].

Регенеранты с развитой корневой системой высаживали в горшечную культуру и продолжали выращивать в условиях культуральной комнаты до образования семян.

Математическую обработку данных проводили в программе Statistica, разницу между вариантами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Таблица 1
Состав питательных индукционных сред, мг/л

Компонент	N ₆ -1	N ₆ -2	N ₆ -3	MS-и	Mix-1	Mix-2	M ₈ -пр	N ₆ -пр
Макросоли	N ₆ *	N ₆	N ₆	MS**	N ₆	N ₆	M ₈ ***	N ₆
Микросоли	N ₆	N ₆	N ₆	MS	MS	MS	M ₈	N ₆
Железо-хелат	N ₆	N ₆	N ₆	MS	MS	MS	M ₈	N ₆
Тиамин HCl – B ₁	1,0	1,0	1,0	0,4	0,4	0,4	5,0	1,0
Пиридоксин HCl – B ₆	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	0,5
Никотиновая кислота – РР	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	3,0	0,5
Глицин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	10,0	2,0
Аланин	–	–	–	–	–	–	10,0	–
Мезо-инозитол	–	–	–	100,0	100,0	100,0	–	–
Казеин гидролизат	–	–	–	–	–	500,0	–	–
L-глутамин	–	–	–	–	–	500,0	–	–
ФУК	–	–	–	–	–	15,0	10,0	10,0
2,4-Д	2,0	1,0	0,5	2,0	2,0	–	–	–
НУК	–	–	1,0	–	–	2,0	2,0	2,0
Кинетин	–	0,2	0,2	–	–	–	–	–
БАП	–	–	–	–	–	0,5	–	–
AgNO ₃	–	–	–	–	–	7,5	–	–
Мальтоза, г/л	–	–	–	–	–	54,0	–	–
Сахароза, г/л	30,0	40,0	40,0	30,0	30,0	–	30,0	30,0
Агар, г/л	8,0	9,0	9,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Примечание. * – среда C. Chu [16]; ** – среда T. Murashige and F. Skoog [17]; *** – среда по прописи, приведенной в работе [8].

Результаты. Пыльники были введены в культуру *in vitro* в 2013 году в количестве 4030 штук. В каждом варианте на питательные среды инокулировано от 20 до 128 эксплантов.

После холодовой обработки пыльников 5°C каллусообразование на разных вариантах сред составило от 0 до 38,8 % (табл. 2), в среднем – 8,43 %. После холодовой обработки 10°C каллусообразование было выше – от 0 до 40,0 % (табл. 3), в среднем 11,02 %. Статистически значимых различий не обнаружено (t=1,09; p=0,28), т.е. процесс каллусообразования происходит одинаково как при холодовой обработке 5°C, так и при 10°C.

Таблица 2
Каллусообразование пыльников риса, прошедших холодовую обработку 5°C, %

Гибрид	Вариант индукционной среды							
	N ₆ -1	N ₆ -2	N ₆ -3	MS-и	Mix-1	Mix-2	M ₈ -пр	N ₆ -пр
1-2	16,2	3,9	6,4	0	7,8	0	2,9	2,6
2-1	3,7	0	0	6,0	5,2	0	12,1	1,7
7-1	3,4	11,5	13,2	7,8	38,8	2,5	19,1	12,5
13-3	14,5	11,6	9,5	12,0	22,1	2,5	10,7	9,6
х	9,5	6,8	7,2	6,5	18,5	1,3	11,2	6,6

Таблица 3
Каллусообразование пыльников риса, прошедших холодовую обработку 10°C, %

Гибрид	Вариант индукционной среды							
	N ₆ -1	N ₆ -2	N ₆ -3	MS-и	Mix-1	Mix-2	M ₈ -пр	N ₆ -пр
1-2	5,0	8,8	0	0	0	0	0	7,5
2-1	3,7	0	8,8	0	3,7	0	17,5	9,4
7-1	22,0	10,0	12,5	25,0	25,0	13,2	26,3	15,0
13-3	28,9	11,0	40,0	10,2	30,0	5,0	4,0	10,0
\bar{x}	14,9	7,5	15,3	8,8	14,7	4,6	12,0	10,5

Каллусные агрегаты, полученные на индукционных средах, были пересажены на среду N₆ для регенерации. После холодовой обработки пыльников температурой 5°C в среднем 57,0 % каллусов образовали побеги (табл. 4). При применении 10°C средний процент каллусов с побегами был несколько ниже – 46,3 %, различия недостоверны (t=1,06; p=0,31).

Число зеленых побегов на каллус, при использовании температуры 5°C, составило в среднем 3,86 шт., а при 10°C этот показатель в среднем был 3,05 шт. Различия также статистически недостоверны (t=0,83; p=0,42). С устранением из расчетов данных, полученных на средах Mix-2 и M₈-пр, разница по числу зеленых побегов на каллус становится достоверной. При холодовой обработке пыльников 5°C среднее число зеленых побегов на каллус \bar{x} =5,08, а при обработке 10°C \bar{x} =3,21, что значительно ниже (t=2,45; p=0,04). Данные, полученные на среде Mix-2, удалили из расчета, поскольку на этой среде получен очень низкий процент каллусообразования (табл. 2 и 3), и только 1 и 2 каллуса с побегами (табл. 4). На среде M₈-пр образовалось очень небольшое количество зеленых побегов в сравнении с альбиносами, что объясняется высоким содержанием железа в составе питательной среды. Избыток Fe⁺ ионов является одним из факторов повышения альбинизма [8].

Соотношение зеленых побегов и альбиносов при использовании температуры 5°C в два раза выше (1,12), чем при температуре 10°C (табл. 4), различия недостоверны. При удалении данных, полученных на среде Mix-2, соотношение при температуре 5°C \bar{x} =1,28, а при температуре 10°C \bar{x} =0,63, различия статистически значимы (t=2,69; p=0,02). Это означает, что в первом случае больше образуется зеленых побегов, а во втором случае – альбиносов.

Таблица 4
Влияние холодовой обработки пыльников на регенерацию побегов из каллуса

Вариант индукционной среды	Холодовая обработка 5° С				Холодовая обработка 10° С			
	Число каллусов с побегами	Процент каллусов с побегами	Число зеленых побегов на каллус	Соотношение зеленых побегов/альбиносов	Число каллусов с побегами	Процент каллусов с побегами	Число зеленых побегов на каллус	Соотношение зеленых побегов/альбиносов
N ₆ -1	26	78,8	4,54	1,49	25	58,1	4,28	0,92
N ₆ -2	22	84,6	4,73	1,86	8	40,0	1,00	0,27
N ₆ -3	24	92,3	5,92	1,63	21	60,0	4,76	0,58
MS-и	15	51,7	3,07	1,00	11	52,4	2,82	0,55
Mix-1	32	45,1	5,22	1,39	21	53,9	3,00	0,96
Mix-2	1	50,0	0	-	2	33,3	3,00	0,60
M ₈ -пр	7	31,8	0,43	0,08	9	47,4	2,11	0,39
N ₆ -пр	3	21,4	7,00	1,50	5	25,0	3,40	0,71
\bar{x}		57,0	3,86	1,12		46,3	3,05	0,62

Выводы. Таким образом, для дальневосточных гибридов холодовая обработка пыльников температурой 5°C значительно эффективнее за счет более высокого выхода зеленых побегов на каллус и меньшего альбинизма.

Практическим результатом данной работы стало получение регенерантных линий риса и их семян, которые переданы в селекционный питомник лаборатории селекции риса Приморского НИИСХ.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность заведующему лабораторией селекции риса ФГБНУ «Приморский НИИСХ» М.В. Анищенко и сотрудникам за предоставленные семена гибридов риса.

Литература

1. Ковалевская В.А. Селекция риса в Дальневосточной зоне рисосеяния // Достижения науки и техники АПК. – 2008. – № 6. – С. 8–10.
2. Холупенко И.П., Бурундукова О.Л. Модели интенсивных сортов риса для условий Дальневосточной зоны рисосеяния // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 12. – С. 96–100.
3. Гончарова Ю.К. Использование культуры пыльников в селекции риса в Китае: обзор // Рисоводство. – 2005. – № 7. – С. 8–12.
4. Костылев П.И. Биотехнология и оценочный этап селекции риса: обзор // Зерновое хозяйство России. – 2009. – № 1. – С. 25–30.
5. Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement // Current Science. – 2005. – Vol. 10. – P. 1870–1878.
6. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origin and exploitation // Plant Biotechnology Journal. – 2010. – № 8. – P. 377–424.
7. Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production // Plant Cell. Tiss. Organ. Cult. – 2011. – Vol. 104. – P. 283–300.
8. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар: Изд-во ВНИИ риса, 2012. – 91 с.
9. Змеева В.Н. Тенденции изменчивости некоторых хозяйствственно полезных признаков в популяции сомаклонов и андрогенных дигаплоидов риса *Oryza sativa* L.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. – Владивосток, 1995. – 27 с.
10. Змеева В.Н., Журавлев Ю.Н. Использование методов биотехнологии в селекции риса в Приморском крае // Научное обеспечение АПК Дальнего Востока: мат-лы науч. сессии (Уссурийск, 18–20 августа 1993 г.). – Новосибирск, 1995. – С. 132–136.
11. Сорта риса селекции ГНУ «Приморский НИИСХ Россельхозакадемии». – Тимирязевский, 2012. – 10 с.
12. Гончарова Ю.К. Использование культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар, 2007. – 56 с.
13. Журавлев Ю.Н. Отчет по гранту ДВО РАН за 2006 г. «Методы биотехнологии в селекции сои и риса». – Владивосток, 2006. – 9 с.
14. Илюшко М.В. Применение феноксикусной кислоты в культуре пыльников риса *in vitro* // Вестник КрасГАУ. – 2014. – № 6. – С.143–148.
15. Il'yushko M.V. The effect of auxin on plant regeneration on rice from anther culture *in vitro* // Science Time. – 2014. – № 10 – P. 160–167.
16. Chu C. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops // Plant Tissue Culture. – 1978. – P. 43–50.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

