

# РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У СОРТОВ РИСА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Бруяко В.Н., мл. науч. сотр., канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»  
г. Краснодар, п. Белозерный

**Аннотация.** В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), нафтилуксусную кислоту (НУК). 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.

**Ключевые слова:** рис, каллусогенез, гормоны, *in vitro*.

При традиционных методах селекции для получения гомозиготных линий необходимо 5-7 поколений, с применением культуры пыльников достаточно двух, поэтому культивирование пыльников применяют для интрогрессии самых различных признаков в отечественные сорта риса. Среди таких признаков адаптивность к различным стрессам (засолению, недостатку минерального питания, высоким температурам [1-4]. Также культуру пыльников используют для фиксации гетерозисного эффекта [5-6] и снижения стерильности при межподвидовой гибридизации [7-9].

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. Эти среды содержат хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота [10-12].

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  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , и более низким содержанием  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , а также более высоким содержанием ауксинов, витаминов и регуляторов роста. Использовали 4 питательные среды, C, C1, RZ, RZ1 (таблица 1, 2).

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 <sub>3</sub>	3134	3134	2830,0	2830,0
СТ 2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	270	270	185,0	185,0
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	4,4	4,4
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	1,5	1,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	231,5	231,5	463,0	463,0
СТ 3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	540	540	400,0	400,0
	KI	0,83	0,83	0,8	0,8
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	1,6	1,6
СТ 4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440	166,0	166,0
СТ 5	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3	37,3
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-	-
	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	-	-
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> 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)	1,0	1,0	2,0	2,0
	Индалилуksусная кислота		2,0	-	2,0
	Кинетин	2,0	2,0	-	2,0
	6-бензиламинопурин (6-БАП)	-	-	-	-
Мальтоза		4,000	5,000	-	-
Сахароза		-	-	30,000	30,000
Агар		7,0	7,000	8,000	8,000

Для предварительной обработки были отобраны побеги, у которых с расстоянием между флаговым и предпоследним листом составляло 5-10 см. Холодовая обработка метелок проходила в течение 5-12 дней при температуре 7<sup>0</sup>С. Стерилизацию проводили в течение 20 минут 20% раствором промышленной "Белизны" (концентрация – 5,5г 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 разработали шкалу: меньше 5, меньше 10, меньше 15, больше 15. Использование данной шкалы позволяет проводить экспресс оценку значительных объемов материала.

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

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

К- во каллусов на чашках Петри, шт	RZ	RZ1	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

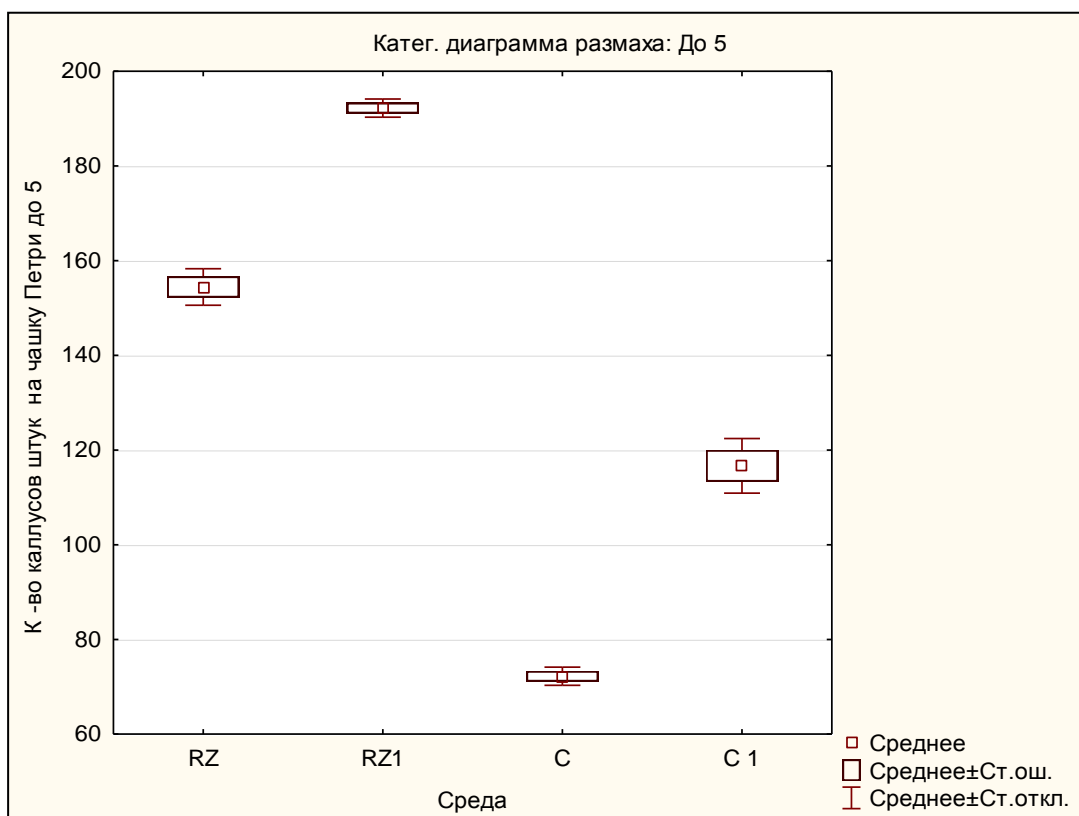


Рис. 1. Выход каллуса на средах RZ, RZ1, С, С1

Среда С<sub>1</sub> 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 С не содержащей индолилуксусную кислоту.

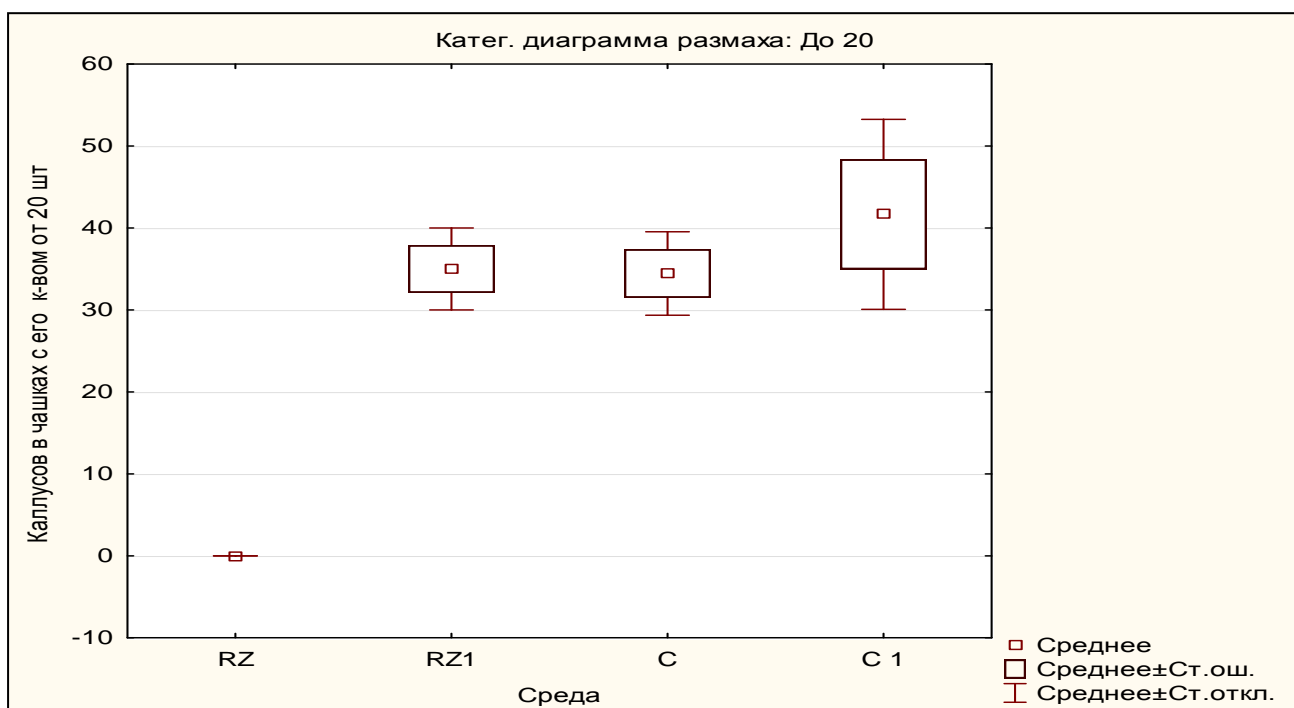
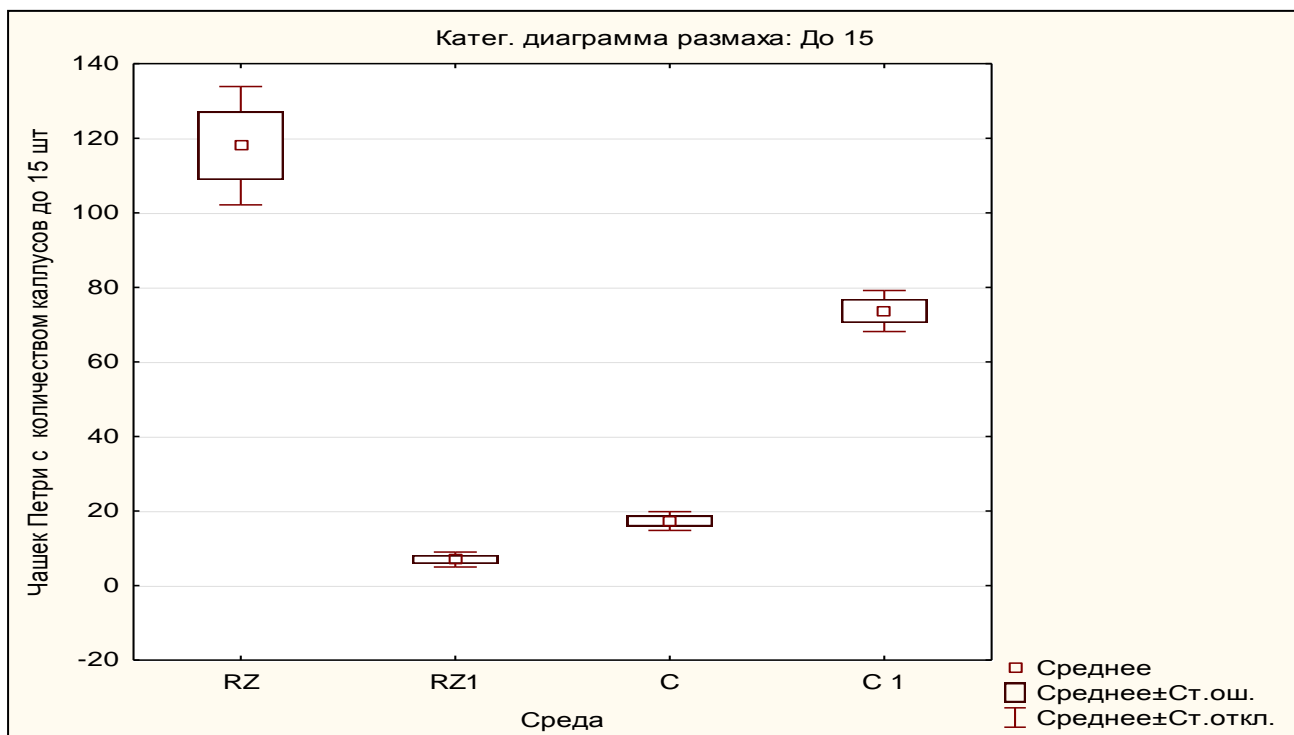


Рис. 2. Эффективность каллусообразования у гибридов риса на средах с различным содержанием гормонов, %

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 нафтилуксусную и дихлорфеноксиуксусную кислоты, то среда C – только 2,4-D.

Среды с повышенным содержанием солей  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , а также более высоким содержанием витаминов и регуляторов роста (RZ, RZ1), обеспечивают более высокий выход каллуса.

## Литература

1. Гончарова, Ю.К. Наследование признака "отзывчивость на культуру пыльников" у риса/ Ю.К. Гончарова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2008. - № 2. - С. 40-42.
2. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса// Краснодар: ВНИИ риса, 2012. - 91 с.
3. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Полиморфизм российских сортов риса по генам широкой совместимости / Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов // Вестник РАСХН. – 2013.- С.41- 43.
4. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Бушман Н.Ю., Верещагина С.А. Сравнительный анализ эффективности питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса// Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2013.- № 6. - С. 6-9.
5. Кучменко А.А., Бушман Н.Ю., Малюченко Е.А., Бруяко В.Н. //Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции: сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов/ВНИИГТИ.- 2016.- С. 34-40.
6. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К. Стерильность при межподвидовой гибридизации риса *Oryza sativa* L. в связи с поиском генов широкой совместимости и отнесением образцов к подвидам *indica* и *japonica*// Сельскохозяйственная биология - 2013.-№ 5.-Р. 61-68.
7. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К. Поиск генов широкой совместимости у образцов риса подвидов *indica* и *japonica* / Е.М. Харитонов, Ю.К. Гончарова // Аграрная наука.- 2013.-№ 3.-Р. 15-17.
8. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К., Малюченко Е.А. Генетика признаков, определяющих адаптивность риса (*ORYZA SATIVA* L.) к абиотическим стрессам// Экологическая генетика. -2015.- Т. 13, № 4.- С. 37-54.
9. Goncharova, J.K. Inheritance of heat resistance in rice / J.K. Goncharova // Russian Journal of Genetics : Applied Research.- 2011.- Vol. 3.- P. 248-251.
10. Goncharova, Yu. K. Selective Elimination of Alleles in Rice Anther Cultures/ Yu. K. Goncharova // Russian Journal of Genetics.- 2013.- Vol. 49.- №. 2.- P. 170–177.
11. Goncharova J.K., Kharitonov E.M. Genetic control of traits determining phosphorus uptake by rice varieties (*Oryza sativa* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. - 2015.- 19 (2).-P.197-204.
12. Goncharova J.K., Kharitonov E.M. Rice Tolerance to the Impact of High Temperatures//Agricultural Research Updates.- 2015.-Vol. 9.- P. 1-37.
13. Goncharova Yu. K. Method of fixing the heterotic effect—implementation on plants (on the hundredth anniversary of the birth of V.A. Strunnikov) // Russian Journal of Developmental Biology.- November 2014.- Vol. 45, № 6.- Pp. 367-370.