

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У СОРТОВ РИСА ПОДВИДА JAPONICA

Малюченко Е.А., м.н.с.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,  
г.Краснодар, п.Белозерный 3

**Аннотация.** Получение дигаплоидов в культуре пыльников применяют для сокращения времени, необходимого при создании сортов или фиксации гетерозисного эффекта [1-3]. Для снижения пустозерности межподвидовых гибридов риса также используют культуру пыльников [4-5]. 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 [6-8]. Эти среды содержат хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, соотношением аммонийного и нитратного азота [9-10].

**Ключевые слова.** Рис, культура пыльников, питательная среда, гибрид.

Питательные среды для получения каллусных культур должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток [8-9].

**Цель.** На примере гибридов риса исследовать особенности каллусогенеза на питательных средах различного состава для индукции процесса *in vitro*.

**Материал и методика.** 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 повышенным содержанием солей ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) и более низким содержанием  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ . В работе использовали 4 питательные среды: C, C1, RZ, RZ1 (таблица 1).

Таблица 1

## Состав сред, использованных в работе (рН 5,6-5,8)

Код	Компоненты	Состав среды, мг/л			
		RZ	RZ1	C	C1
	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
	Индалилуксусная 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 расстояние между флаговым и предпоследним листом составляло 5-10 см. Холодовая обработка метелок проходила в течение 5-12 дней при температуре 7 °С. Стерилизацию проводили в течение 20 минут 20 % раствором промышленной "Белизны" (концентрация – 5,5 г 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.

**Результаты и обсуждение.** 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 средами С1 и С, рекомендуемой международным институтом риса (таблица 2-3).

Таблица 2

Сравнительный анализ эффективности питательных сред для каллусообразования при получении дигаплоидов в культуре пыльников

Среды	Количество чашек с высаженными пыльниками шт.	Общее количество чашек с каллусом, шт.	Число чашек Петри с каллусом, шт.
RZ	250	157	< 5 – 94 шт.
			<10 – 37 шт.
			<15 – 26 шт.
			>15- 0 шт.
RZ1	250	184	<5 – 116 шт.
			<10 – 61 шт.
			<15- 1 шт.
			>15 – 6 шт.
С	250	75	<5 – 44 шт.
			<10 - 23 шт.
			<15 – 3 шт.
			>15 – 5 шт.
С1	250	115	<5 – 72 шт.
			<10 – 22 шт.
			<15 – 16 шт.
			>15 – 6 шт.

Таблица 3

Эффективность каллусообразования у гибридов риса на средах с различным содержанием солей

Количество 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

Как показано на рисунке 1 среды RZ и RZ1 достоверно превосходили по выходу каллуса С и С1.

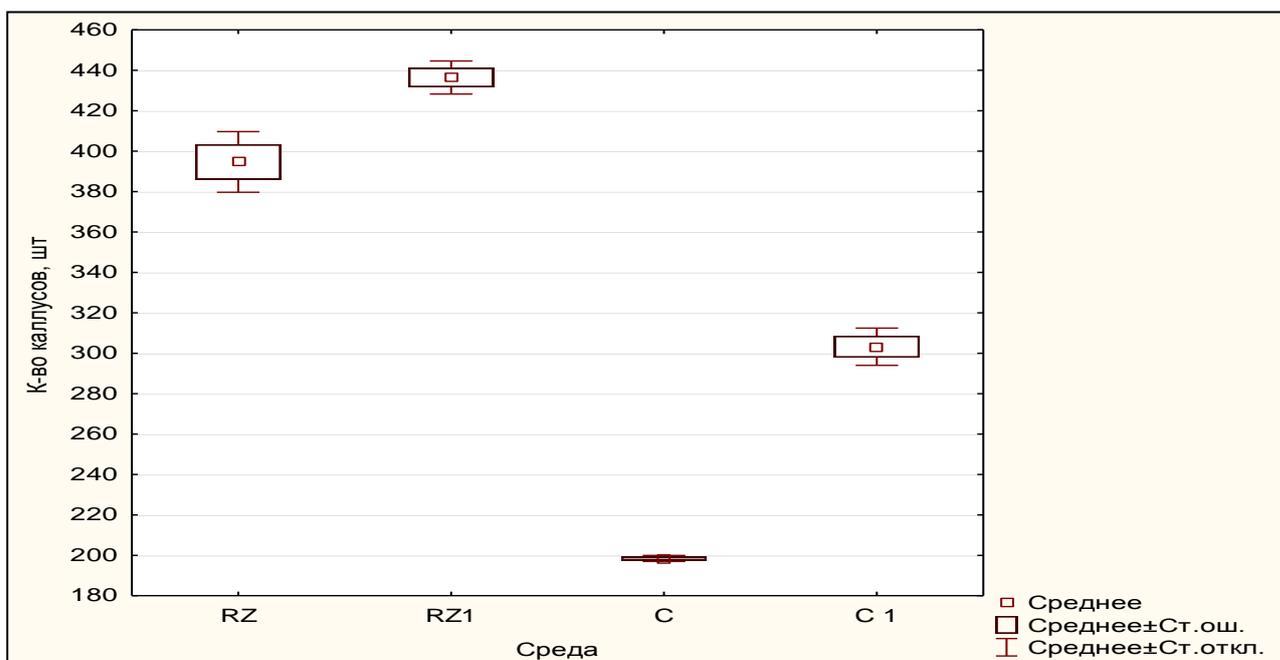


Рисунок 1 – Выход каллуса на средах RZ, RZ1 , C, C1.

### Выводы.

1. Таким образом, среды RZ и RZ1 достоверно превосходили по выходу каллуса, C и C1.
2. Среды с повышенным содержанием солей  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  обеспечивают более высокий выход каллуса.

### Литература

1. Гончарова Ю. К. Метод закрепления гетерозисного эффекта – Реализация на растениях (К столетию со дня рождения В.А. Струнникова) // Онтогенез. – 2014. - Т. 45. - № 6. - С. 442–446.
2. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях патент на изобретение RUS 2465771 13.07.2011.
3. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Генетические основы повышения продуктивности риса // Краснодар. ООО «Просвещение ЮГ». - 2015. - С. 314.
4. Харитонов Е.М., Ю.К. Гончарова 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. - С. 61-68.
5. 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.

6. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К. Поиск генов широкой у образцов риса подвидов *indica* и *japonica* / Е.М. Харитонов, Ю.К. Гончарова // Аграрная наука. - 2013. - № 3. - С. 15-17.
7. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К., Малюченко Е.А. Генетика признаков, определяющих адаптивность риса (*Oryza sativa* L.) к абиотическим стрессам. Экологическая генетика. - 2015. - Т. XIII. - № 4. - С. 37-54.
8. Гончарова, Ю.К. Наследование признака "отзывчивость на культуру пыльников" у риса / Ю.К. Гончарова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2008. - № 2. - С. 40-42.
9. 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.
10. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса // Краснодар: ВНИИ риса. - 2012. – С. 91.