

ПОЛУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАНТНЫХ ЛИНИЙ РИСА МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ

Н. Г. Черткова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, tycik17082012@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-4005-9771;

П. И. Костылев, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории селекции и семеноводства риса, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848;

Н. В. Калинина, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

В. Ю. Донцова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0003-1083-9881;

О. В. Шумская, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0002-7285-5580

ФГБНУ «АНЦ «Донской»,

347740, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

В процессе создания сорта наряду с классическими методами выведения сортов все чаще стали применять биотехнологические и молекулярно-генетические. К этим методам относится технология культивирования изолированных пыльников, основанная на феномене андрогенеза. В статье представлены результаты работы по получению андрогенетических линий риса из 7 гибридов первого поколения. Цель работы – изучение способности гибридов риса к каллусообразованию на искусственных питательных средах и получению растений-регенерантов с последующей визуальной оценкой пloidности. Получение дигаметоидных гомозиготных линий позволит ускорить селекционный процесс. Отбор метелок риса проводили в поле на стадии одноядерной пыльцы в фазу трубкования. В общей сложности культивировали 7218 пыльников, из которых получили 259 каллусов. Наиболее отзывчивыми к образованию каллусов были комбинации Акустик x Nerica 1, Nerica 1 x Акустик, Капитан x Акустик. Частота регенерации от количества каллусов составила 9,13 %. Получено в общей сложности 794 новообразования, из которых сформировалось 46 растений, в том числе 26 альбиносных и 20 зеленых. Наибольшее количество растений образовалось у гибрида из комбинации Капитан x Акустик – 22 шт. (из них зеленых 14 шт.). Из выживших зеленых растений-регенерантов по комплексу морфологических признаков 2 растения оказались гаплоидами, имевшими мелкие стерильные цветки и пыльники, тонкие и узкие листья, 5 – дигаметоидами с хорошо озерненными метелками и средними по размерам листьями и 2 – тетраплоидами, которые имели широкий лист, большую метелку с очень крупными цветками, имеющими низкую фертильность. Растения и семена переданы селекционерам для дальнейшей работы.

Ключевые слова: рис (*Oryza sativa* L.), пыльник, андрогенез, каллус, регенерация, гаплоид, дигаметоид.

Для цитирования: Черткова Н. Г., Костылев П. И., Калинина Н. В., Донцова В. Ю., Шумская О. В. Получение регенерантных линий риса методом культуры пыльников // Зерновое хозяйство России. 2022. Т. 14, № 4. С. 22–27. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-82-4-22-27.



DEVELOPING REGENERATED RICE LINES BY THE ANTHOR CULTURE METHOD

N. G. Chertkova, junior researcher of the laboratory for cell breeding, tycik17082012@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-4005-9771;

P. I. Kostylev, Doctor of Agricultural Sciences, professor, main researcher of the laboratory for rice breeding and seed production, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848;

N. V. Kalinina, junior researcher of the laboratory for cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

V. Yu. Dontsova, junior researcher of the laboratory for cell breeding, ORCID ID: 0000-0003-1083-9881;

O. V. Shumskaya, junior researcher of the laboratory for cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-7285-5580

FSBSI Agricultural Research Center “Donskoy”,

347740, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

When developing a variety, along with the classical breeding methods, there are increasingly being used biotechnological and molecular genetic methods. These methods include a cultivation technology of isolated anthers, based on the phenomenon of androgenesis. The current paper has presented the results of developing androgenetic rice lines from 7 hybrids of the first generation. The purpose of the work was to study the ability of rice hybrids to form callus on artificial nutrient media and develop regenerated plants followed by a visual estimation of ploidy. Developing dihaploid homozygous lines will speed up the breeding process. The selection of rice panicles was carried out in the field in the shooting phase at the stage of mononuclear pollen. There were cultivated 7218 anthers, of which there were obtained 259 calli. The combinations ‘Akustik x Nerica 1’, ‘Nerica 1 x Akustik c’, ‘Kapitan x Akustik’ were the most responsive to callus formation. The regeneration frequency to the number of calli was 9.13 %. There were identified 794 new formations, from which there were formed 46 plants, including 26 albino and 20 green. The largest number of plants was formed in the hybrid ‘Kapitan x Akustik’ (22 pcs., 14 of which are green). Among the survived green re-

generated plants, according to a complex of morphological traits, two plants turned out to be haploids with small sterile flowers and anthers, thin and narrow leaves; five plants were dihaploids with well-grained panicles and medium-sized leaves; two plants were tetraploids that had a wide leaf, a large panicle with very large flowers, but with low fertility. Plants and seeds were handed over to breeders for further work.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.), anther, androgenesis, callus, regeneration, haploid, dihaploid.

Введение. Рис является одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Растения риса часто подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как засуха, засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. Рост этих абиотических и биотических факторов вынуждает селекционеров создавать улучшенные сорта, имеющие более высокий потенциал по урожайности, хозяйственно-ценным свойствам и вкусовым качествам.

В процессе создания сорта наряду с классическими методами выведения сортов все чаще стали применять биотехнологические и молекулярно-генетические. К этим методам относится технология культивирования изолированных пыльников, основанная на феномене андрогенеза *in vitro* (Головки и др., 2019). Метод культивирования изолированных тканей и клеток на искусственных питательных средах в стерильных условиях используют для сохранения и размножения ценных генотипов, оздоровления посевного материала и, самое главное, ускорения селекционного процесса (Илюшко и Ромашова, 2017).

Этот метод дает возможность получать гаплоиды и дигаплоиды, культивирование зародышей позволяет получать растения из нескрещиваемых гибридных семян, а также преодолевать нескрещиваемость некоторых растений. Культура пыльников и регенерация растений из микроспор значительно облегчают последующее получение рекомбинантов после программы гибридизации. Более того, культура пыльников сокращает время, необходимое для достижения гомозиготности, так как спонтанное индуцированное удвоение числа гаплоидных хромосом приводит к появлению гомозиготных диплоидных растений (Гученко, 2016). Андрогенез *in vitro* широко применяется во многих рисоводческих странах мира (Mishra et al., 2016; Ilyushko et al., 2019). Большая работа в данном направлении проводится в ФГБНУ «ФНЦ риса» (Гончарова, 2012; Савенко и др., 2020; Савенко и др., 2016).

Целью исследования являлось получение растений-регенерантов риса на искусственных питательных средах с оценкой плоидности по комплексу морфологических признаков.

Материалы и методы исследований.

Объектом исследования являлись гибриды первого поколения риса посевного *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, полученные в результате скрещивания лучших по хозяйственно ценным признакам сортов. Отбор образцов проводили на полях лаборатории селекции и семеноводства риса ФГБНУ «АНЦ «Донской» в г. Пролетарске Ростовской области. Изучались следующие комбинации: Jukava

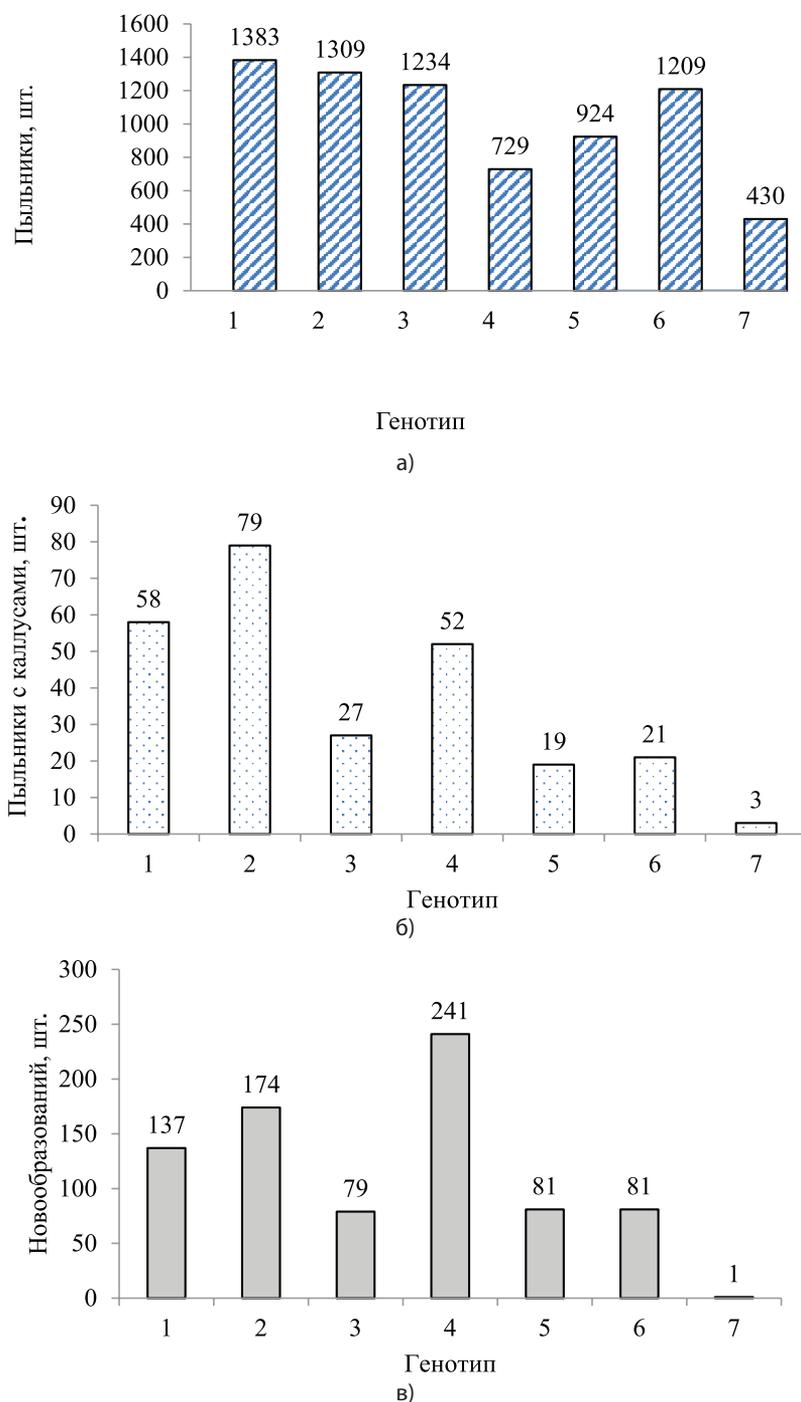
(591/20) x Кубояр, Корсика x Акустик, Капитан x Кубояр, Капитан x Акустик, Акустик x Nerica 1, Аргамак x Акустик и Дин Сян x Кубояр.

Отбор метелок риса (доноров пыльников) проводили в полевых условиях на стадии средней и поздней одноядерной пыльцы в фазу трубкования. Расстояние от ушка флагового листа до ушка следующего листа было, согласно методике, от 5 до 9 см. Отобранные метелки перед введением в культуру пыльников подвергали поверхностной стерилизации, то есть обработке 96%-м спиртом в течение 3 мин, которая удаляет наружную инфекцию. После этого метелки помещали в сосуды с водой и подвергали воздействию низких положительных температур (5 °C) в течение 7 дней. Затем проводили стерилизацию в 5%-м растворе гипохлорита натрия 10 мин. Далее метелки трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности, поэтому все манипуляции проводили в ламинарном боксе стерильными инструментами. Выделенные пыльники инокулировали на индукционную питательную среду Блейдса, которую предварительно автоклавировали при температуре 121 °C в течение 15 мин.

Культивирование пыльников проводили в термостате при температуре 27–28 °C до образования каллусов. Пробирки с пыльниками находились в полной темноте. Каждую неделю делали осмотр пробирок под микроскопом для фиксации появившихся каллусов и их количества, а также браковку зараженных пробирок. Культивирование пыльников продолжалось 5–6 недель до появления новообразований (каллусов или эмбриоидов). При достижении размеров 1 мм и более каллусы переносили на питательную среду Мурасиге и Скуга для регенерации растений (Бушман и Верещагина, 2013). Пробирки с эксплантами инкубировали в освещенной ростовой комнате с контролем температуры 25±2 °C, освещенностью 2000 Лк и фотопериодом 15 ч / 9 ч. Ежедневно фиксировали образование зеленых побегов, браковали пробирки с потемневшими каллусами и заражением. Пересадку зеленых побегов для укоренения проводили при образовании 2–3 листьев и корешков. Растения с хорошо развитой корневой системой пересаживали в стерилизованный грунт в горшки и 25 дней выращивали в условиях световой комнаты. Полив растений осуществляли дистиллированной водой. После этого растения-регенеранты переносили в теплицу, где они развивались до цветения и созревания.

Результаты и их обсуждение. В 2021 г. на индукционную питательную среду Блейдса было высажено 7218 пыльников гибридов F1

по семи комбинациям. Максимальное количество пыльников было высажено в комбинации Nerica 1 x Акустик (1383 шт.), а минимальное – Jukava (591/20) x Кубояр (430 шт.) (рис. 1, а).



1 (Nerica 1x Акустик); 2 (Акустик x Nerica 1); 3 (Корсика x Акустик); 4 (Капитан x Акустик); 5 (Капитан x Кубояр); 6 (Аргмак x Акустик); 7 (Jukava (591/20) x Кубояр).

Рис. 1. Показатели андрогенной способности в культуре пыльников *in vitro* гибридов первого поколения разных генотипов риса: а) количество высаженных пыльников, шт.; б) количество пыльников с каллусами, шт.; в) количество новообразований, шт.

Fig. 1. Indicators of androgenic ability in the anther culture *in vitro* of hybrids of the first generation of different rice genotypes: а) number of planted anthers, pcs.; б) number of anthers with calluses, pcs.; в) number of new formations, pcs.

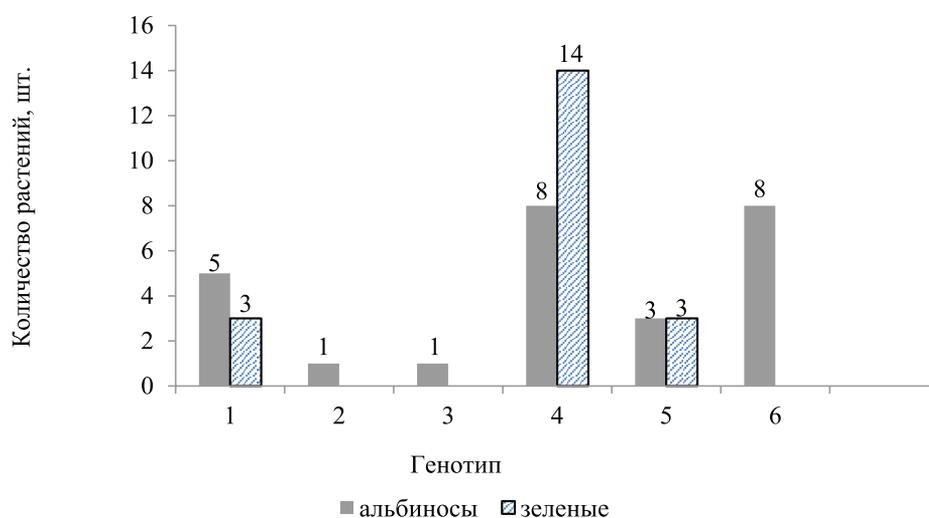
Каллусообразование началось на 30–33-й день с момента посадки пыльников на питательную среду. Все комбинации оказались с разной степенью отзывчивости, что связа-

но с генетическими различиями способности генотипов риса по образованию каллусов в культуре пыльников (Miah, 1985). Самым отзывчивым к формированию каллусов был ги-

брид Акустик x Nerica 1 – 79 шт. с частотой образования 6,04 %, а комбинация Jukava (591/20) x Кубояр почти не сформировала каллусов – 3 шт. с частотой образования 0,7 % (рис. 1, б).

Степень отзывчивости к формированию каллусов определяли отношением числа новообразований к числу культивируемых пыльников в пересчете на 100 %. В общей сложности было получено 794 новообразования (эмбриоида), максимальное у гибрида Капитан x Акустик – 241 шт. с частотой формирования – 33,06 %, а минимальное у Jukava (591/20) x Кубояр – 1 шт. (0,23 %) (рис. 1, в). В прямой и обратной комбинации скрещивания сортов Акустик и Nerica 1 также наблюдали большое количество новообразований (137; 174 шт.).

У гибрида Jukava (591/20) x Кубояр формирования растений не произошло. В других комбинациях из новообразований сформировались растения, среди которых были и зеленые, и альбиносы. Было получено 46 растений, из них 20 зеленых и 26 альбиносов. Растения альбиносы погибли на ранних стадиях развития из-за отсутствия хлорофилла. Наибольшее количество растений образовалось из комбинации Капитан x Акустик – 22 шт. (из них зеленых 14 шт.) (рис. 2), а частота регенерации от количества каллусов составила 9,13 %. Это указывает на то, что у сорта Акустик имеются гены, способствующие формированию каллусов и регенерантов. Поэтому в дальнейшей работе нужно использовать гибриды с его участием.



1 (Nerica 1 x Акустик); 2 (Акустик x Nerica 1); 3 (Корсика x Акустик); 4 (Капитан x Акустик); 5 (Капитан x Кубояр); 6 (Аргмак x Акустик).

Рис. 2. Выход растений-регенерантов риса в культуре пыльников *in vitro*
Fig. 2. Number of rice regenerated plants in anther culture *in vitro*



1 – тетраплоид; 2 – дигамплоид; 3 – гаплоид

Рис. 3. Морфологические признаки метелок растений-регенерантов риса различной пloidности

Fig. 3. Morphological traits of panicles of rice regenerated plants of different ploidy

Оценка зеленых растений-регенерантов риса по уровню пloidности проводили косвенным методом, а именно по комплексу морфологических признаков. Выжившие зеленые растения разделили следующим образом: к первой группе (гаплоиды) относили 2 растения, ко второй (дигамплоиды) – 5 растений, к третьей (тетраплоиды) – 2 растения (рис. 3).

1) гаплоиды – растения с мелкими цветками и пыльниками, с тонким и узким листом, не имеют семян;

2) дигамплоиды – растения со средними листьями и хорошо озерненными метелками;

3) тетраплоиды – растения с широким листом, большой метелкой с очень крупными цветками, имеющими низкую фертильность.

На формирование растений-регенерантов большое влияние оказали генотипы гибридов, способные образовывать каллусы и эмбриониды из пыльников. Корреляционный анализ взаимосвязи между выходом растений-регенерантов риса и количеством эмбрионидов показывает тесную положительную связь между этими признаками ($r = 0,81 \pm 0,09$). График

регрессии (рис. 4) отображает тенденцию зависимости выхода растений-регенерантов от количества эмбриоидов. Если провести перпендикуляр из значения 100 на оси абсцисс, то он пересечет линию регрессии в точке, гори-

зонтальная проекция которой на ось ординат составит около семи. Это видно в уравнении регрессии, то есть при увеличении количества эмбриоидов на 100 штук количество растений-регенерантов повышалось на 7 штук.

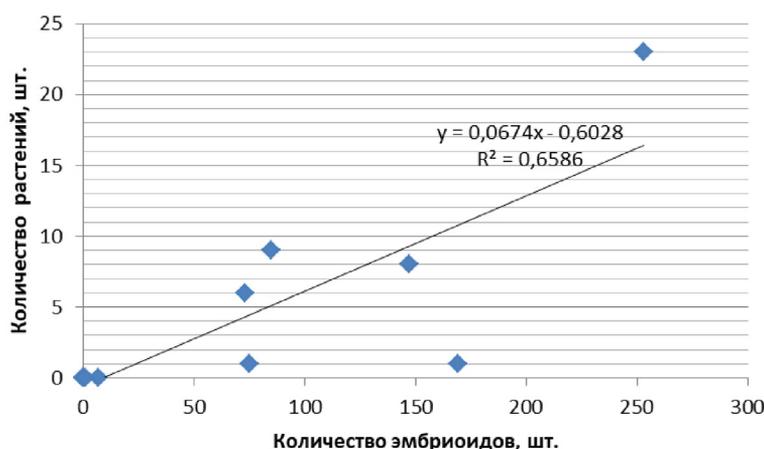


Рис. 4. Зависимость выхода растений-регенерантов риса от количества эмбриоидов
Fig. 4. Correlation between a number of rice regenerated plants and a number of embryos

Общее количество полученных взрослых регенерантов составило 9 растений, все они сформировали метелки и дали побеги кущения. Восемь растений относились к комбинации Капитан х Акустик и одно растение – Капитан х Кубояр. Цветение растений началось в первой половине апреля 2022 г., они различались по морфотипу и относились

к двум разновидностям по окраске колосковых чешуй: *italica* и *nigro-apiculata*. Колосковые чешуи различались по длине от 5 до 8 мм. Некоторые колоски данных растений несли недоразвитые пыльники и были стерильными.

Характеристики этих растений представлены в таблице.

Морфологические особенности растений-регенерантов риса Morphological features of rice regenerated plants

№	Высота растений, см	Кустистость, шт./раст.	Длина метелки, см	Длина листа-флага, см	Количество колосков, шт.
гаплоиды					
6	44	7	8	16,5	70
8	49	4	8	15,5	75
среднее	46,5	5,5	8	16,0	72,5
диплоиды					
1	58	6	11,5	9,5	100
2	56	5	10	15	90
3	59	6	8,5	10	70
4	72	4	12	18	120
7	67	3	12,5	19,5	80
среднее	62,4	4,8	10,9	14,4	92
тетраплоиды					
5	67	3	15	23,5	65
9	65	2	13	16,5	85
среднее	66,0	2,5	14	20,0	75

Примечание. № 6 – гибрид Капитан х Кубояр, остальные №№ – Капитан х Акустик.

Высота растений гаплоидов (46,5 см) в среднем была ниже, чем у диплоидов (62,4 см), а у тетраплоидов – выше (66,0 см). Такая же тенденция отмечена и по длине метелки. Больше количество колосков формировалось у диплоидов, при этом у них была высокая фертильность. У тетраплоидов формировались более длинные флаговые листья и более крупные колоски. У гаплоидов колоски были мелкими и стерильными.

Исследование продолжается, поскольку у гаплоидных растений-регенерантов не сформировались семена, и необходимо их обрабатывать колхицином для удвоения числа хромосом и дальнейшего использования в селекционном процессе. Растения-регенеранты пересажены в рисовый чек в ОП «Пролетарское» для дальнейшей работы. С тепличных растений дигаметоидов, у которых произошло спонтанное

удвоение хромосом, были собраны семена и высеяны в поле для размножения.

Выводы. Получены регенерантные линии на основе 7 гибридных комбинаций риса. Наиболее отзывчивые к методу культуры пыльников *in vitro* комбинации Акустик х Nerica 1, Nerica 1 х Акустик, Капитан х Акустик. По всем

изученным комбинациям сформировалось 46 растений, из них 26 альбиносных и 20 зеленых. В результате оценки плоидности выживших растений по морфологическим признакам было выявлено гаплоидов 2 шт., дигаплоидов – 5 шт. и тетраплоидов – 2 шт.

Библиографические ссылки

1. Бушман Н. Ю., Верещагина С. А. Эффективность питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса // Рисоводство. 2013. № 1(22). С. 13–16.
2. Головки С. Г., Калинина Н. В., Яцына А. А., Вожжова Н. Н., Ионова Е. В. Изучение способности к андрогенезу в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы // Зерновое хозяйство России. 2019. № 6 (66). С. 41–45.
3. Гончарова, Ю. К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. Краснодар: ВНИИ риса, 2012. 91 с.
4. Гученко, С. С. Сравнительная характеристика и отбор дигаплоидных линий риса по хозяйственно ценным признакам // Дальневосточный аграрный вестник. 2016. № 1. С. 10–15.
5. Илюшко М. В., Ромашова М. В. Создание регенерантных линий методом культуры пыльников *in vitro* для селекции риса на российском Дальнем Востоке // Дальневосточный аграрный вестник. 2017. № 4(44). С. 1–9.
6. Савенко Е. Г., Коротенко Т. Л., Глазырина В. А., Шундрин Л. А. Ускоренное получение генетически стабильных (гомозиготных) форм риса на основе селекционно ценных образцов с целевыми генами устойчивости к пирикулярнозу методом культуры пыльников *IN VITRO* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2020. № 85. С. 220–226.
7. Савенко Е. X., Королева С. В., Мухина Ж. М., Глазырина В. А., Шундрин Л. А. Использование метода культуры пыльников для создания исходного материала сельскохозяйственных культур // Рисоводство. 2016. № 1–2(30–31). С. 76–79.
8. Ilyushko M. V., Romashova M. V. Seasonality of androgenetic responses in the anther culture *IN VITRO* in rice (*Oryza Sativa L.*) // Agricultural Biology. 2019. T. 54, № 3. P. 557–565.
9. Mishra R., Rao G. In-vitro Androgenesis in Rice: Advantages, Constraints and Future Prospects // Rice Science. 2016. 23(2). P. 57–68.

References

1. Bushman N. Yu., Vereshchagina S. A. Effektivnost' pitatel'nykh sred dlya induktsii kallusobrazovaniya u gibridov risa [Efficiency of nutrient media for the induction of callus formation in rice hybrids] // Risovodstvo. 2013. № 1(22). S. 13–16.
2. Golovko S. G., Kalinina N. V., Yatsyna A. A., Vozhzhova N. N., Ionova E. V. Izuchenie sposobnosti k androgenezu v kul'ture pyl'nikov ozimoi myagkoi pshenitsy [The study of the ability to androgenesis in the anther culture of winter bread wheat] // Zernovoe khozyaistvo Rossii. 2019. № 6 (66). S. 41–45.
3. Goncharova Yu. K. Ispol'zovanie metoda kul'tury pyl'nikov v selektsii risa. [Use of the anther culture method in rice breeding] Krasnodar: VNIi risa, 2012. 91 s.
4. Guchenko S. S. Sravnitel'naya kharakteristika i otbor digaploidnykh linii risa po khozyaistvenno tsennym priznakam [Comparative characteristics and selection of dihaploid rice lines according to economically valuable traits] // Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik. 2016. № 1. S. 10–15.
5. Ilyushko M. V., Romashova M. V. Sozdanie regenerantnykh linii metodom kul'tury pyl'nikov *in vitro* dlya selektsii risa na rossiiskom Dal'nem Vostoke [Development of regenerative lines by anther culture *in vitro* for rice breeding in the Russian Far East] // Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik. 2017. № 4(44). S. 1–9.
6. Savenko E. G., Korotenko T. L., Glazyrina V. A., Shundrina L. A. Uskorennoe poluchenie geneticheskii stabil'nykh (gomozigotnykh) form risa na osnove selektsionno tsennyykh obraztsov s tselevymi genami ustoychivosti k pirikulyariozu metodom kul'tury pyl'nikov *IN VITRO* [Accelerated production of genetically stable (homozygous) forms of rice based on breeding valuable samples with targeted blast resistance genes by the anther culture method *IN VITRO*] // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2020. № 85. S. 220–226.
7. Savenko E. X., Koroleva S. V., Mukhina Zh. M., Glazyrina V. A., Shundrina L. A. Ispol'zovanie metoda kul'tury pyl'nikov dlya sozdaniya iskhodnogo materiala sel'skokhozyaistvennykh kul'tur [Use of the anther culture method to develop initial material of agricultural crops] // Risovodstvo. 2016. № 1–2(30–31). S. 76–79.
8. Ilyushko M. V., Romashova M. V. seasonality of androgenetic responses in the anther culture *IN VITRO* in rice (*Oryza Sativa L.*) // Agricultural Biology. 2019. T. 54, № 3. P. 557–565.
9. Mishra R., Rao G. In-vitro Androgenesis in Rice: Advantages, Constraints and Future Prospects // Rice Science. 2016. 23(2). P. 57–68.

Поступила: 24.06.22; доработана после рецензирования: 25.07.22; принята к публикации: 27.07.22.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Костылев П. И. – постановка цели и задач, формирование методологии исследования и концепции статьи, Калинина Н. В. – сбор и анализ литературных данных, Чертова Н. Г. – написание текста статьи, Донцова В. Ю., Шумская О. В. – лабораторные опыты, посадка пыльников, выращивание регенерантов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.