

3. Барбаянова Т.А. Распространенность и вредоносность корневых гнилей злаков в Приморском крае // Сб. науч. тр. / Приморский СХИ. – Уссурийск, 1978. – Вып. 73. – С. 74–79.
4. Возбудители болезней зерновых / З.М. Азбукина, Т.А. Барбаянова, Л.Н. Егорова [и др.] // Возбудители болезней сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, 1980. – С. 84–204.
5. Методика государственного сортиспытания сельскохозяйственных культур / Госагропром СССР, Гос. комиссия по сортиспытанию с.-х. культур. – М., 1989. – Вып. 2. – 194 с.
6. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса / сост. М.В. Лукьянова, Н.А. Родионова, А.Я. Трофимовская; ВИР. – Л., 1981. – 31 с.
7. Афанасенко О.С. Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев // ВИЗР. – Л., 1987. – 19 с.
8. Чумаков А.Е., Захарова Т.И. Вредоносность болезней сельскохозяйственных культур. – М.: Агропромиздат, 1990. – 127 с.
9. Методы фитопатологии / З. Кираи, З. Клемент, Ф. Шоймоши [и др.]; пер. с англ. С.В. Васильевой [и др.]; под ред. и с предисл. М.В. Горленко. – М.: Колос, 1974. – 343 с.
10. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта: с основами статистической обработки результатов исследований. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1979. – 416 с.



УДК 633.18:631.527.8:581.143.6

М.В. Илюшко

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ РИСА *IN VITRO*

Изучены особенности регенерации четырех гибридов риса *Oryza sativa L.* подвида *japonica* в культуре пыльников *in vitro* на питательных средах, содержащих феноксиуксусную кислоту (ФУК) 10,0 мг/л. Частота каллусообразования на средах N_6 и M_8 была одинаковой (4,2 и 4,8%). При двухступенчатой регенерации доля альбиносов после среды M_8 в два раза выше, чем после среды N_6 ($p = 0,01$). При одноступенчатой регенерации зеленых растений не было получено. Показана возможность инокуляции асептически чистых пыльников риса без применения стерилизующих агентов.

Ключевые слова: рис, феноксиуксусная кислота (ФУК), культура пыльников, каллус, регенерация, *in vitro*.

M.V. Ilyushko

THE APPLICATION OF PHENOXYACETIC ACID IN RICE ANTER CULTURE *IN VITRO*

*The regeneration peculiarities of four rice hybrids *Oryza sativa L.* subspecies *japonica* in the anther culture *in vitro* on the nutrient medium containing phenoxyacetic acid 10 mg/l are studied. The callus formation frequency on N_6 and M_8 media was equal (4,2% and 4,8%). In the two-step regeneration the albino proportion after M_8 medium is two times higher than the after N_6 medium ($p = 0,01$). In the one-step regeneration the green plants were not obtained. The possibility of inoculation of the aseptically clean rice anthers without sterilizing agents is shown.*

Key words: rice, phenoxyacetic acid, anther culture, callus, regeneration, *in vitro*.

Введение. Получение андроклинических гаплоидов риса в культуре *in vitro* стало рутинной процедурой во всем мире [1–3] и в нашей стране [4–6]. Традиционно гаплоиды получают двуступенчато путем культивирования пыльников риса: сначала индуцируют каллусообразование, затем вызывают морфогенетический ответ каллуса [3, 7, 8].

Chen et al. [Цит. по: 7] и Zhuo et al. [9] отмечают возможность одноступенчатого получения регенерантов риса при использовании феноксиуксусной кислоты (ФУК). При этом процедура упрощается, каллусообразование и регенерация происходят на одной среде без пересадок каллуса, уменьшается альбинизм. Определена оптимальная концентрация ФУК для риса *Oryza sativa L.* подвидов *indica* и *japonica*.

Отмечено положительное действие ФУК и его аналогов при двуступенчатой регенерации риса. Каллус сохраняет свою регенерационную способность до 15 месяцев и 9 пассажей, что значительно дольше, чем при использовании других ауксинов [10], и это дает возможность увеличить общий выход зеленых побегов [9].

В настоящей работе была поставлена **задача** изучить особенности регенерации дальневосточных гибридов риса в культуре пыльников *in vitro* на питательных средах, содержащих ФУК.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовано потомство четырех гибридов второго поколения риса посевного *O. sativa* подвида *japonica*, полученное в лаборатории селекции риса Приморского НИИСХ. Родительскими формами являлись сорта дальневосточной и инорайонной селекции.

Рис выращивали в 2013 году в разных условиях:

- в контролируемых условиях культуральной комнаты в течение всего вегетационного периода: $t=20^{\circ}\text{C}$, освещенность 4 тыс. лк, фотопериод 16/8 часов (КТ);
- на вегетационной площадке лаборатории селекции риса, далее в конце фазы кущения растения риса помещали в контролируемые условия культуральной комнаты: $t=20^{\circ}\text{C}$, освещенность 4 тыс. лк, фотопериод 16/8 часов (ВП-КТ);

– на вегетационной площадке лаборатории селекции риса до периода сбора метелок (ВП).

В каждом варианте выращено 4–7 растений от каждого гибридного потомства.

Метелки срезали с соломиной, когда расстояние между флаговым и вторым листом составляло 5–7 см, согласно работе Ю.К. Гончаровой [6]. Стадию микроспор (наибольшая встречаемость в конце одноядерной стадии) определяли по методике ВИР [11]. Далее метелки помещали в цилиндрах с водой в холодильник при $t=5^{\circ}\text{C}$ или $t=10^{\circ}\text{C}$ на 7 суток.

Испытывалось два способа получения растений-регенерантов: одноступенчатая и двуступенчатая регенерация в культуре пыльников.

Двуступенчатая регенерация проводилась в два этапа. На первом этапе в культуре пыльников индуцировали пролиферацию каллуса на 2 вариантах сред: N₆ [2] и M8 (среда по прописи, приведенной в работе [6]), содержащих по 10,0 мг/л ФУК и 2,0 мг/л НУК. В качестве источника углеводов использовали сахарозу (3%), желирующего вещества – агар (0,8%), рН=5,8. Затем каллус пересаживали на регенерационную среду N₆ [2] с содержанием 6-БАП (1,0 мг/л), кинетина (1,0 мг/л), сахарозы (9%), агара (0,8%), рН=5,8.

Для одноступенчатой регенерации использованы питательные среды те же, что и для двуступенчатой регенерации.

Метелки вынимали из влагалища листа в асептических условиях пинцетом без применения стерилизующих агентов. Далее извлекали пыльники из цветков риса под бинокулярной лупой и высаживали в пробирки диаметром 14 мм на поверхность инициальных сред, по два в каждую пробирку. Инокулированные пыльники культивировали в темноте при $t=25^{\circ}\text{C}$ до каллусообразования. Каллусные агрегаты, размер которых достигал 2–5 мм, пересаживали на регенерационную среду в пробирки диаметром 21 мм и помещали в культуральную комнату при освещенности 4 тыс. лк, температуре 24–25 $^{\circ}\text{C}$, фотопериоде 16/8 часов.

При одноступенчатой регенерации в половине случаев пробирки с каллусом 2–5 мм сразу переносили в ту же культуральную комнату. В другом случае каллус снимали для двуступенчатой регенерации, затем дождались повторного образования каллуса, который переносили в культуральную на свет.

Особенности регенерации оценивали по следующим показателям: частота каллусообразования (процент пыльников, образовавших каллус), частота образования альбиносов (процент от всех регенерантов). Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывали среднее значение признака, t критерий Стьюдента между вариантами для чистоты инокуляции и каллусообразования, X критерий Ван-дер-Вандена для регенерации [12].

Результаты и их обсуждение

Влияние условий выращивания исходных растений риса на асептическую чистоту инокулированных пыльников

В культуру *in vitro* было введено 1994 асептически чистых пыльников риса. Чистота инокуляции пыльников зависела от способа выращивания исходных растений (табл. 1). Растения, выращенные в культуральной комнате и перенесенные в культуральную с вегетационной площадки, были асептически чистыми (инфицирование менее одного процента). У растений, растущих на вегетационной площадке весь период до срезания метелок, 15 % пыльников оказалось загрязненными инфекцией и отбраковано.

Таблица 1

Асептическая чистота введения пыльников риса в культуру *in vitro* в зависимости от условий выращивания растений-доноров

Условия выращивания риса	Количество посаженных пыльников, шт.	Количество чистых пыльников, шт.	Загрязненность инфекцией, %
Культуральная комната	608	608	0,0
Вегетационная площадка-культуральная	652	646	0,9
Вегетационная площадка	874	740	15,3*

* – превышение над другими вариантами при $p < 0,05$.

Таким образом, с точки зрения асептической чистоты растения, растущие в контролируемых условиях хотя бы за две недели до введения в культуру *in vitro* пыльников, имеют преимущество. Но для их выращивания требуются дополнительные затраты на создание температурного режима и режима освещения. С другой стороны, на 15,3 % инфицированных пыльников с вегетационной площадки затрачиваются средства на приготовление питательных сред, привлекаются дополнительные трудозатраты. А в случае работы с ценными, ограниченными в количестве образцами возможна безвозвратная потеря инокулированных пыльников на самых ранних этапах культивирования.

Частота каллусообразования у гибридов риса

Незрелые пыльники риса F_2 поколения высаживали на два варианта индукционных сред. Каллусообразование наблюдалось на обоих вариантах (табл. 2). В среднем частота каллусообразования составила на среде N_6 – 4,2 %, на среде M_8 – 4,8 %. Статистически различия недостоверны, т.е. для каллусообразования оба варианта сред равнозначны.

Таблица 2

Частота каллусообразования в культуре пыльников гибридов F_2 риса

Гибрид	Среда N_6				Среда M_8			
	Число инокулированных пыльников, шт.	Частота каллусообразования, %	Число инокулированных пыльников, шт.	Частота каллусообразования, %	Число инокулированных пыльников, шт.	Частота каллусообразования, %	Число инокулированных пыльников, шт.	Частота каллусообразования, %
Культуральная комната								
1-2	–	–	20	0	24	0	40	0
2-1	80	0	40	22,5	80	2,5	40	5,0
7-1	40	0	32	0	40	0	40	0
13-3	40	0	40	2,5	40	0	–	–
$\bar{x} = 2,3$								
Вегетационная площадка-культуральная комната								
1-2	40	2,5	40	0	40	0	40	2,5
2-1	38	0	–	–	40	5,0	–	–
7-1	68	10,3	40	5,0	64	17,2	40	0
13-3	48	0	50	0	48	0	50	4,0
$\bar{x} = 3,3$								
Вегетационная площадка								
1-2	38	2,6	40	5,0	34	2,9	24	0
2-1	58	1,7	64	9,4	58	6,9	40	15,0
7-1	56	7,1	40	12,5	42	16,7	38	15,8
13-3	52	7,7	50	4,0	56	8,9	50	4,0
$\bar{x} = 7,5^*$								

Примечание: \bar{x} – средняя частота каллусообразования, %; * – превышение над двумя другими вариантами при $p < 0,05$.

Растениеводство

Проводилась низкотемпературная предобработка пыльников перед высадкой на питательные среды. При обработке 5°C в течение недели 4,0 % пыльников индуцировали каллус, при 10°C – 5,1 %, различия статистически незначимы.

Условия выращивания исходных растений риса оказали значительное влияние на интенсивность каллусообразования (табл. 2). Среднее значение для растений-доноров из культуральной комнаты 2,3 %, для растений, выращенных на вегетационной площадке с переносом в культуральную, – 3,3 %. Лучшим вариантом получения растений-доноров является выращивание их в течение всего периода на вегетационной площадке. Интенсивность каллусообразования увеличивается более чем в два раза и составляет 7,5 %, что статистически значимо ($p<0,05$). Следует заметить, что максимальные значения были получены при выращивании растений-доноров в культуральной (22,5 % для гибрида 2-1) и при выращивании на вегетационной площадке с переносом в культуральную комнату (17,2 % для гибрида 7-1).

Растения, выращенные в культуральной комнате в течение всего периода или только во втором периоде роста до сбора метелок, образовали мелкие пыльники. Микроспоры в них были обычного размера. В.Ю. Горбунова [13], изучая андрогенез яровой мягкой пшеницы *in vitro*, пришла к выводу, что размер пыльников и микроспор не обязательно связан между собой. Увеличение количества мелких микроспор в пыльнике уменьшает интенсивность эмбриоидогенеза. В нашем эксперименте снижение количества микроспор в пыльниках, участвующих в процессе образования каллуса, могло стать одной из причин пониженного каллусообразования у большинства гибридов. С другой стороны, период сбора метелок увеличивается, нужная фаза микроспор длится дольше. Это является преимуществом [14], позволяя посадить больше пыльников, что особенно важно при работе с ценностными образцами.

Из результатов, изложенных выше, следует, что унифицировать условия выращивания исходных растений для получения максимального количества каллусов затруднительно. Для разных гибридов необходимо подбирать в каждом случае свои условия выращивания растений-доноров.

Генотипическая составляющая считается одним из важнейших факторов, ограничивающих получение гаплоидов в культуре *in vitro* [3, 7, 8, 15–17]. В нашем эксперименте все четыре гибридса оказались результативными. Минимальная частота каллусообразования у гибрида 1-2 (1,4 %). В два раза больше у гибрида 13-1 (2,8 %), различия статистически незначимы. У гибридов 2-1 и 7-1 этот показатель 6,8 и 7,0 % соответственно, превышение над гибридом 1-2 подтверждено статистически при $p<0,05$.

При рассмотрении частоты каллусообразования у растений, выращенных на вегетационной площадке, картина несколько изменяется. Достоверные различия обнаруживаются между парами гибридов 1-2 и 7-1, а также 13-1 и 7-1 ($p<0,05$).

Побегообразование у гибридов риса при двуступенчатой регенерации

Каллусные агрегаты пересаживали на регенерационную среду для формирования побегов. Каллусы всех гибридов были способны к морфогенетическим ответам. Их общее число представлено в таблице 3. Отдельные каллусы образовали до 22 зеленых регенерантов и до 15 альбиносов. Всего было получено 386 регенеранта, из них 39 % – зеленые; 61 % – альбиносы. У гибридов, полученных на индукционных средах без содержания ФУК, зеленых было больше – 58 %, остальные – альбиносы (неопубликованные данные).

Индукционная среда для каллусообразования у пыльников риса оказывала последействие. После среды N₆ 44,9 % побегов были альбиносами, после среды M₈ доля их увеличилась в два раза, различия достоверны на 1%-м уровне значимости. Общее количество побегов после индукционных сред N₆ и M₈ 215 и 171 шт. соответственно.

Таблица 3
Побегообразование у гибридов F₂ риса при двуступенчатой регенерации

Гибрид	После среды N ₆				После среды M ₈			
	t=5°C		t=10°C		t=5°C		t=10°C	
	Всего, шт.	Доля альбиносов, %	Всего, шт.	Доля альбиносов, %	Всего, шт.	Доля альбиносов, %	Всего, шт.	Доля альбиносов, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Культуральная комната								
1-2	–	–	0	0	0	0	0	0
2-1	0	0	74	37,8	8	100	15	100
7-1	0	0	0	0	0	0	0	0

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
13-3	0	0	0	0	0	0	—	—
Бегетационная площадка-культуральная комната								
1-2	4	0	0	0	0	0	14	100
2-1	0	0	—	—	0	0	—	—
7-1	52	42,3	0	0	21	81,0	0	0
13-3	0	0	0	0	0	0	11	63,6
Бегетационная площадка								
1-2	0	0	0	0	11	100	0	0
2-1	11	100	24	83,3	5	100	40	97,5
7-1	0	0	24	33,3	12	75,0	20	25
13-3	24	12,5	2	50,0	13	100	1	100
$\bar{x} = 44,9^*$					$\bar{x} = 86,8^*$			

Примечание: \bar{x} – средняя доля альбиносов, %; * – разница между средними показателями статистически достоверна ($p<0,01$).

Наши результаты хорошо согласуются с данными других авторов. Питательная среда M_8 лучше подходит для культуры пыльников риса подвида *indica* [9]. Высокое содержание ионов железа в среде (в 2 раза выше, чем в среде N_6) является избыточным для гибридов подвида *japonica*, приводя к удвоению доли альбиносов. Недостаток или избыток F^{2+} считается фактором увеличения альбинизма у риса [6].

Достоверных различий по признаку «доля альбиносов» между генотипами, температурами предобработки пыльников и условиями выращивания растений-доноров не было обнаружено.

Побегообразование у гибридов риса при одноступенчатой регенерации

Непосредственной регенерации риса на питательных средах с содержанием ФУК не было получено. На каллусах наблюдался ризогенез, но отсутствовал геммогенез. Три каллусных агрегата сформировали по одному слабому регенеранту-альбиносу.

Регенерационная способность генотипов индивидуальна и зависит от взаимовлияния эндогенных (в экспланте) и экзогенных (в питательной среде) гормонов [13]. Для одноступенчатой регенерации риса в сочетании с ФУК рекомендовано содержание НУК (0,5–2,0 мг/л) и цитокинина 6-бензиламинопурин 0,5–1,0 мг/л [6, 9]. В некоторых случаях эмбриоидогенез у сортов пшеницы происходит и на безгормональной питательной среде [13]. Дальневосточным гибридам риса требуется подбор комбинации гормонов для одноэтапного получения регенерантов.

Литература

1. Niizeki B.H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture // Proc. Japan Acad. – 1968. – Vol. 44. – P. 554–557.
2. Chu C. The N_6 medium and its applications to anther culture of cereal crops // Plant Tissue Culture. – 1978. – P. 43–50.
3. Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement // Current Science. – 2005. – Vol. 10. – P. 1870–1878.
4. Харченко П.Н., Кучеренко Л.А. Получение растений риса из пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. – 1977. – № 4. – С. 15–16.
5. 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.
6. Гончарова Ю.К. Использование культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар, 2007. – 56 с.
7. Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // Plant Cell. Rep. – 2011. – Vol. 30. – P. 839–857.
8. Эмбриологические основы андроклиники пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова [и др.]. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
9. Phenilacetic acid stimulation of direct shoot formation in anther and somatic tissue cultures of rice (*Oryza sativa* L.) / L.S. Zhuo, Si H.M., S.H. Cheng [et al.] // Plant Breeding. – 1996. – Vol. 115. – P. 295–300.

10. Analogues of phenoxyacetic acid and the generation of calluses from seeds of indica rice / T. Yasuda, S. Miyano, Y. Yamamoto [et al.] // Plant Cell Physiol. – 1990. – Vol. 31, № 6. – P. 763–766.
11. Абрамова Л.И. Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и пыльцевых зернах культурных растений: метод. указания. – Л.: Изд-во ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), 1986 . – 63 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
13. Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2000. – 48 с.
14. Ferrie A.M., Caswell K.L. Isolated microsporeculture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2011. – Vol. 104. – P. 301–309.
15. Гончарова Ю.К. Наследование признака «отзывчивость на культуру пыльников» у риса // Вестник Рос. акад. с.-х. наук. – 2008. – № 2. – С. 40–42.
16. Теоретические аспекты получения гаплоидов в культуре изолированных пыльников злаков / Т.И. Дьячук, С.В. Тучин, С.В. Столярова [и др.] // Вестник Рос. акад. с.-х. наук. – 2007. – № 2. – С. 11–13.
17. Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклипной гаплоидии яровой мягкой пшеницы: эмбриологический подход // Аграрная Россия. – 2009. – № 1. – С. 34–38.



УДК 581.9

Е.М. Антипова, О.В. Енуленко

**НОВЫЕ НАХОДКИ РЕДКИХ РАСТЕНИЙ ВО ФЛОРЕ ПРИБАЙТАКСКОЙ ЛУГОВОЙ СТЕПИ
(ИДРИНСКИЙ РАЙОН, КРАСНОЯРСКИЙ КРАЙ)**

Дается характеристика физико-географических и административных границ Идринского района. Приведено описание растительности, экологических условий, почвообразующих пород, рельефа, климатических условий и системы зонально-секторного распределения растительности в пределах Прибайтакской луговой степи. В период полевых практик выявлен флористический состав данной территории и собран гербарный материал. Приводится перечень новых находок редких растений, произрастающих на территории Идринского района.

Ключевые слова: флора, Прибайтакская луговая степь, Идринский район, ареал, гербарий, обилие вида, растение.

E.M. Antipova, O.V. Enulenko

**THE NEW FINDINGS OF THE RARE PLANTS IN THE FLORA OF PRIBAITAKSKAYA MEADOW STEPPE
(IDRINSKIY DISRICT, KRASNOYARSK TERRITORY)**

The characteristic of the physical-geographical and administrative borders of Idrinskiy district is given. The description of vegetation, ecological conditions, soil-forming rocks, relief, climatic conditions and the system of zonal-sector vegetation distribution within Pribaytakskaya meadow steppe is outlined. During the field practices the floristic composition of the territory is revealed and the herbarium material is collected. The list of new findings of the rare plants growing in the Idrinskiy district is presented.

Key words: flora, Pribaytakskaya meadow steppe, Idrinskiy district, natural habitat, herbarium, abundance of sort, plant.

Идринский район находится в Минусинской впадине Сыдо-Ербинской котловины на правобережье р. Енисей (юг Красноярского края), ограничен с севера с. Иннокентьевка, по р. Сисим, с запада – вверх по р. Джирим, Колдыбай, с юга границы определяются с. Большие Кныши, Средняя Салба, через с. Куреж, Большой и Малый Хабык до Иннокентьевки. Восточная граница проходит по р. Сыда, Сисим, вверх по р. Джирим и Колдыбай до с. Добромысловки ($54^{\circ}38'$ – $54^{\circ}48'$ с.ш. и $90^{\circ}57'$ – $92^{\circ}46'$) [Черепнин, 1957].

Район исследования расположен в предгорьях Восточного Саяна, с высотами 200–300 до 750 м над уровнем моря, с курумами в понижении. Рельеф района гористый, с куэстово-грядовым характером. Распо-