

## ВПЛИВ ВУГЛЕЦЕВОГО КОМПОНЕНТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* *ORYZA SATIVA* L.

Важливим компонентом живильного середовища є джерело вуглецю, яке виконує в умовах *in vitro* дві функції – трофічну та підтримує необхідний осмотичний потенціал в клітинах ізолюваних пиляків за їхнього культивування. Найчастіше для цього використовують сахарозу. Вважають, що підвищена її концентрація важлива для всіх злаків на етапі формування калюсних і ембріодних структур. Що стосується рису, то концентрації сахарози в середовищах, використаних різними авторами, варіюють. В окремих роботах, на етапі утворення калюсу використовували 6 % сахарозу, на етапі диференціації – 3 %. В інших роботах 6 % сахарозу застосовували на обох етапах, знижуючи вміст цього вуглеводу до 4–5 % в процесі регенерації [1–3]. Деякі дослідники використовують у якості джерела вуглецю у середовищах для культивування пиляків рису інші вуглеводи, а саме мальтозу [4–6]. Порівняльне дослідження впливу сахарози та мальтози в живильному середовищі, проведене вченими [6–7], показало генотипову специфічність у потребі того чи іншого вуглеводу задля оптимального проходження андрогенезу *in vitro*.

За результатами наших попередніх досліджень (2011–2013 рр.) встановлено, що отримання та дослідження культур *in vitro* *Oryza sativa* L. в умовах Півдня України є перспективним. Отримання гаплоїдів через культуру ізолюваних пиляків представляє альтернативу традиційним селекційним підходам з поліпшення цієї культури. Методика, яка була успішно застосована у попередніх дослідженнях, дозволяла нам разом з достатньою кількістю зелених регенерантів, отримувати велику кількість альбіно. Наступні дослідження, що стосуються андрогенезу рису *in vitro* в нашій лабораторії спрямовані на зменшення частки хлорофіл-дефектних рослин серед отриманих регенерантів. Мета дослідження – вивчення впливу різних джерел вуглецю (сахарози та мальтози) в живильному середовищі на ефективність андрогенезу в культурі *in vitro* пиляків рису.

### Матеріали і методи

В якості дослідного рослинного матеріалу застосовували пиляки рису гібридів F<sub>2</sub>: Ariette x Преміум (№ 3); Гарант x Престиж (№ 6); Merle x Престиж (№ 8); Командор x Престиж (№ 14); Fhoi bonne x Престиж (№ 17), які вирощували у дослідницьких «чеках» Інституту рису м. Скадовськ (Україна). Волоті зрізали, коли вакуолізовані мікроспори більшості пиляків знаходились на середньо-пізній стадії розвитку. Зрізані волоті, які знаходилися у покривному листку попередньо витримували у воді при температурі 8–10 °С протягом 4–7 діб. Стерилізацію проводили розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв, надалі, зливали його і заливали 0,01 н HCl (10 хв) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою стерильною водою.

Пиляки експлантували у чашки Петрі (діаметром 60 мм) на агаризовані живильні середовища та культивували у темряві при 25 °С. Для індукції новоутворень (калюсних та ембріодних культур) використовували два варіанти живильного середовища: 1) середовище N<sub>6</sub> за модифікацією Herath et al., 2007 [10], доповнене регуляторами росту 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК) – 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноцтовою кислотою (2,4-Д) – 3 мг/л та кінетином (Кін) – 1 мг/л, вуглеводом – сахарозою (60 г/л); 2) середовище N<sub>6</sub> за модифікацією Rukmini et al., 2013 [11], доповнене регуляторами росту 2,4-Д – 2 мг/л та Кін – 0,5 мг/л, вуглеводом – мальтозою (30 г/л).

Для регенерації з калюсних та ембріодних культур рису використали також два варіанти живильного середовища [11]: 1) середовище МС, доповнене регуляторами росту 6-бензиламінопурином (БАП) – 0,75 мг/л, Кін – 0,25 мг/л та НОК – 0,25 мг/л, вуглеводом – мальтозою (30 г/л); 2) те ж середовище, у якому замість мальтози використовували сахарозу (30 г/л).

Калюсні та ембріодні культури, отримані на кожному з двох варіантів середовищ для індукції, пересаджували на два регенераційних середовища та культивували за умови освітлення при температурі 26 °С. У результаті регенерацію зелених рослин враховували у чотирьох варіантах досліду (табл. 1).

## Використані живильні середовища із різними джерелами вуглецю

	Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3	Варіант 4
Індукційне середовище	N <sub>6</sub> в модифікації Herath et al. (сахароза)		N <sub>6</sub> в модифікації Rukmini et al. (мальтоза)	
Середовище для регенерації	сахароза	мальтоза	сахароза	мальтоза

Для росту регенерантів використовували безгормональне живильне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

## Результати та обговорення

За результатами проведеного дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F<sub>2</sub> рису показана висока чутливість даних форм до наданих умов *in vitro* за культивування пиляків. Слід наголосити, що значний рівень формування новоутворень був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій. Виявлений чіткий вплив на даний показник складу індукційного середовища (рис. 1, 2).

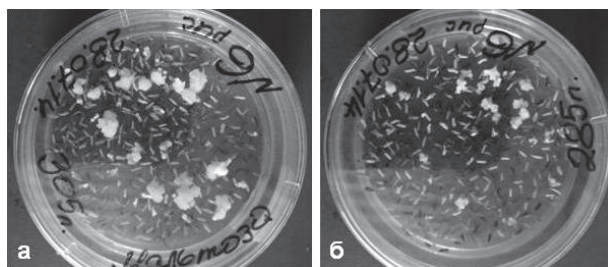


Рис. 1. Формування новоутворень в культурі пиляків рису № 3 на різних індукційних середовищах: а – з мальтозою; б – з сахарозою

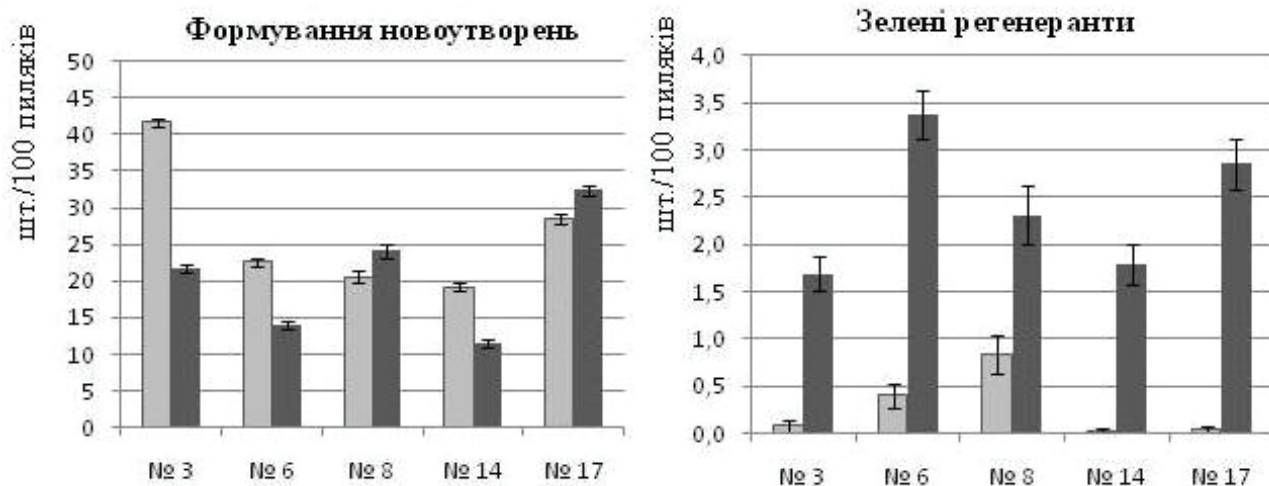


Рис. 2. Вплив індукційного середовища на різні етапи андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків різних гібридів рису: – середовище з мальтозою; – середовище з цукрозою

Так, три (за номерами 3, 6, 14) з п'яти генотипів більше новоутворень формували на середовищі N<sub>6</sub> з мальтозою, а два – на живильному середовищі N<sub>6</sub>, де як джерело вуглецю використовували сахарозу. Слід зазначити, що здатність до регенерації новоутворень, одержаних на двох дослідних індукційних середовищах, була дуже різною. Більша частина новоутворень усіх досліджених генотипів із середовища з мальтозою була не спроможна регенерувати зелені рослини, тоді як з новоутворень із індукційного середовища з сахарозою – отримано на порядок більше зелених регенерантів від усіх п'яти гібридів рису (табл. 2, рис. 2).

Слід зазначити, що середовище з мальтозою було вперше випробувано у нашій лабораторії. До цього року ми успішно використовували в якості індукційного середовища N<sub>6</sub> за модифікацією Herath et al. [10], однак разом з достатньою кількістю зелених регенерантів, ми отримували велику кількість хлорофілдефектних рослин. Саме з метою зменшення альбіносів серед регенерантів і було залучено до експерименту інше живильне середовище. В результаті з новоутворень, одержаних на новому середовищі, ми не отримали жодного альбіноса, але й регенерація зелених рослин була занизькою.

У роботі також досліджували ефективність гаплопродукції за різних варіантів живильних

Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* рису

Генотип	Кількість пиляків	Індукційне середовище	Новоутворення		Зелені рослини-регенеранти	
			шт. / на 100 висаджених пиляків	шт.	шт. / на 100 висаджених пиляків	
№ 3	2372	мальтоза	41,61 ± 1,01*	1	0,08 ± 0,06	
	4479	сахароза	21,64 ± 0,60	39	1,69 ± 0,19*	
№ 6	2232	мальтоза	22,63 ± 0,89*	8	0,40 ± 0,13	
	4936	сахароза	14,04 ± 0,49	81	3,38 ± 0,26*	
№ 8	2023	мальтоза	20,61 ± 0,90	15	0,84 ± 0,20	
	2295	сахароза	24,10 ± 0,89^	30	2,31 ± 0,31*	
№ 14	3097	мальтоза	19,21 ± 0,71*	1	0,03 ± 0,03	
	3577	сахароза	11,55 ± 0,53	31	1,79 ± 0,22*	
№ 17	2672	мальтоза	28,56 ± 0,87	1	0,04 ± 0,04	
	3860	сахароза	32,36 ± 0,75*	59	2,85 ± 0,27	

Примітки: \* – достовірно при  $P < 0,001$ , ^ – достовірно при  $P < 0,01$ .

середовищ для регенерації, які також розрізнялись за джерелом вуглецю, однак мали однаковий мінеральний та гормональний склад: варіант 1, варіант 2, варіант 3, варіант 4 (рис. 3).

За результатами дослідження виявлено найбільш оптимальну комбінацію між індукційним живильним середовищем та середовищем для

регенерації (варіант 2), що за наших умов експерименту дозволяє отримувати достовірно більшу кількість зелених рослин-регенерантів рису від усіх досліджених генотипів. За другого варіанта експерименту (культивування пиляків на середовищі  $N_6$  в модифікації [10] з наступним культивуванням новоутворень на середовищі MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л мальтози) усі гібриди показали максимальний рівень регенерації зелених рослин (рис. 3). Найбільшою кількістю рослин-регенерантів характеризувався № 6; три інших гібриди за даним показником не розрізнялись та мали достовірно меншу кількість зелених рослин за таку у гібриду № 6.

Виявлено різкий негативний вплив на здатність новоутворень до регенерації за третього варіанта дослідження: культивування пиляків на середовищі  $N_6$  в модифікації Rukmini et al. [11] з наступним культивуванням новоутворень на середовищі MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л сахарози.

Кількість отриманих альбіносних рослин була незначною (1–3 рослини на варіантах 1 та 2 у генотипів № 3, № 6 та № 17) порівняно із нашими минулорічними результатами: 0,02–2,97 шт./100 пиляків у 2013 р. та 9,64–22,41 шт./100 пиляків у 2012 р. Надалі зелені рослини-регенеранти пересаджували на безгормональне живильне середовище MS з половинною концентрацією солей (рис. 4).

Аналізуючи отримані дані (табл. 1, рис. 1–3) вдалося встановити оптимальний варіант індукційного та регенераційного середовищ, який забезпечує ефективний процес формування новоутворень і сприяє виходу достатньої кількості зе-

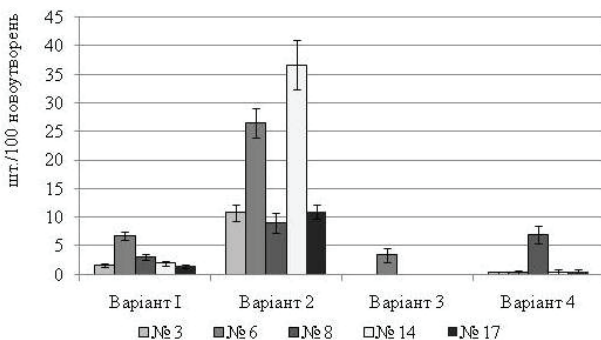


Рис. 3. Регенерація зелених рослин рису в культурі *in vitro* за культивування пиляків та новоутворень на різних живильних середовищах



Рис. 4. Регенерація зелених рослин в культурі пиляків рису



лених регенерантів за мінімальної кількості альбіносних рослин-регенерантів.

### Висновки

Культивування пиляків рису на середовищі N<sub>6</sub> з додаванням НОК – 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноцтова кислота (2,4-Д) – 3 мг/л та кінетин – 1 мг/л; 60 г/л сахарози [10]; з наступним культиву-

ванням новоутворень на середовищі MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л мальтози забезпечує оптимальний рівень індукції новоутворень (калюсних та ембріодних культур) і сприяє регенерації з них достатньої кількості зелених рослин за мінімальної кількості альбіносних рослин.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Sripichitt P., Ozawa T., Otani M., Shimada T. Improved method for anther culture of an indica rice cultivar of Thailand // *Plant Prod. Sci.* – 2000. – 3. – P. 254–256.
2. Tran Thi Thanh Xa, Nguyen Thi Lang Rice breeding for high grain quality through anther culture // *Omonrice.* – 2011. – 18. – P. 68–72.
3. Chen Q.F., Wang C.L., Lu Y.M., Shen M., Afza R., Duren M.V., Brunner H. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement // *Euphytica.* – 2001. – 120, N 3. – P. 401–408.
4. Mkuya M.S., Hua-min S. I., LIU Wen-zhen, SUN Zong-xiu. Effect of 137Cs gamma rays to panicles on rice anther culture // *Rice Science.* – 2005. – 12, N 4. – P. 299–302.
5. Martinez A.L., Ventura E., Maldonado U., Sánchez M.M., Bazaldúa Cr., Del Villar A.A. Characterization of storage proteins and anther culture for the development of high nutritional quality rice genotypes // *Biotechnologica Aplicada.* – 2005. – 22. – P. 41–44.
6. Bagheri N., Babaeian-Jelodar N., Ali Ghanbari. Evaluation of effective factors in anther culture of iranian rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars // *Biharean Biologist.* – 2009. – 3, N 2. – P. 119–124.
7. Trejo-Tapia G., Amaya U.M., Morales G.S., Jimenez-Aparicio A. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* – 2002. – 71. – P. 41–46.
8. Замбріборщ І.С., Шестопап О.Л., Добрава Г.О., Шпак Д.В. Особливості андрогенезу *in vitro* міжсортних гібридів *Oryza sativa* L. української селекції // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.* / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2013. – 12. – С. 224–228.
9. Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Ігнатова С.О., Шпак Д.В. Вплив попередньої обробки волотей *Oryza sativa* L. на морфогенез в культурі пиляків *in vitro* // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.* / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – 15. – С. 144–148
10. Herath H.M.I., Bandara D.C., Samarajeewa P.K. Effect of culture media for another culture of Indica rice varieties and hybrids of Indica and Japonica // *Tropical Agricultural Research & Extension.* – 2007. – 10. – P. 17–22.
11. Rukmini M., Rao G.J.N., Rao R.N. Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two Indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids – Ajay and Rajalaxmi // *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* – 2013. – 1, N 2. – P. 69–76.

### SHESTOPAL O.L.<sup>1</sup>, ZAMBRIBORSHCH I.S.<sup>1</sup>, SHPAK D.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com*

<sup>2</sup> *Rice Research Institute at Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Ukraine, 75705, Kherson region, Skadovsk district, Antonovka village, e-mail: shpak\_dmitry@mail.ru*

### EFFECT OF CARBON COMPONENT CULTURE MEDIUM ON EFFECTIVENESS ANDROGENESIS IN VITRO ORYZA SATIVA L.

**Aims.** Study the effect of different carbon sources (sucrose and maltose) in the culture medium on the efficiency of androgenesis *in vitro* in anther culture of rice. **Methods.** Obtaining of rice double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results.** The influence different variants pretreatment of rice panicle on the processes of induction and regeneration in anther culture of rice were studied. The 218 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** To increase the formation of embryo like structures in anther culture of rice panicles should be incubated for the pretreatment in water at 6–8 °C during 3–7 days. The positive effect on the formation of embryoides and sufficient amount of green regenerants and the low formation albino regenerants from using the cold pretreatment of panicle by solution abscisic acid (0.5 mg/L) were showed.

**Keywords:** rice hybrids, anther culture *in vitro*, callus, regeneration.