

УДК 602.6:58:633.181.1

## **ВПЛИВ ГЕЛЕУТВОРЮЮЧОГО КОМПОНЕНТУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ АНДРОГЕНЕЗУ IN VITRO ORYZA SATIVA L.**

І. С. ЗАМБРИБОРЦЬ<sup>1</sup>, О. Л. ШЕСТОПАЛ<sup>1</sup>, Д. В. ШПАК<sup>2</sup>, Г. О. ДОБРОВА<sup>1</sup>, С. О. ІГНАТОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3  
e-mail: izambriborsh@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут рису Української академії аграрних наук  
Україна, 75705, с. Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл.  
e-mail: shpak\_dmitry@mail.ru

**Мета.** Дослідити вплив хімічно модифікованого крохмалю D-5aM, що міститься в живильному середовищі, на ефективність андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків рису. **Методи.** Отримання подвоєних гаплоїдних ліній рису в культурі пиляків *in vitro*. Статистичні методи. **Результати.** Вивчено вплив різних варіантів джерела гелеутворювання в живильному середовищі на процеси індукції і регенерації в культурі пиляків рису. Отримано 119 зелених рослин-регенерантів. **Висновки.** Показано негативний вплив на формування зелених регенерантів рису використання в якості гелеутворюючого компонента живильного середовища хімічно модифікованого крохмалю D-5aM.

**Ключові слова:** рис, культура пиляків *in vitro*, калюс, регенерація, хімічно модифікований крохмаль.

**Вступ.** Андрогенні лінії подвоєних гаплоїдів масово застосовують для прискорення селекції різних культур [1, 2]. Результати наших досліджень андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. [3–5] показали перспективність та результативність проведення даних робіт в умовах Півдня України. Отримання гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків представляє альтернативу традиційним селекційним підходам з поліпшення цієї культури. Використання агару високої очистки та інших синтетичних гелеутворюючих речовин значно підвищує собівартість отриманих шляхом андрогенезу *in vitro* ліній. В останні роки ведеться пошук речовин, якими можна замінили коштовний агар при одночасному забезпеченні реалізації морфогенного потенціалу пилякової культури й істотному зниженні вартості живильного середовища. Так, О. В. Білінською вперше встановлено позитивний вплив на ембріодогенез і регенерацію у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі [6, 7], природні кукурудзяні крохмалі [8, 9], та зернові крохмалі гороху [10]. Метою цього дослідження була оцінка ефективності використання у складі живильного середовища для культивування *in vitro* пиляків рису посівного хімічно модифікованого крохмалю D-5aM.

### **Матеріали і методи**

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F<sub>2</sub>: Адмірал / Hashiri-moshi (№ 202); Hashiri-moshi / Віконт (№ 206); UIP-4558 / Віконт (№ 212); UIP-4896 / Віконт (№ 213); Янтарь / Дон-4299 (№ 227), які вирощували у дослідницьких «чеках» Інституту рису м. Скадовськ (Україна). Волоті зрізали, коли вакуолізовані мікроспори більшості пиляків знаходились на середньо-пізньої стадії розвитку. Попередню обробку зрізаних волотей, які знаходилися у покривному листку, проводили у воду при температурі 8 °C–10 °C протягом 4–7 діб.

Стерилізацію проводили розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв., надалі, зливали його і заливали 0,01 н. розчин HCl (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою стерильною водою. Пиляки експлантували у чашки Петрі ( $\varnothing = 60$  мм) на тверді живильні середовища та культивували у темряві при 25 °С. Для індукції новоутворень використали два варіанти живильного середовища N<sub>6</sub> за модифікацією Rukmini et al. [11] з додаванням 2,4-Д — 2 мг/л та кінетин 0,5 мг/л; і 30 г/л мальтози. В першому варіанті за гелеутворюючий компонент брали агар, а в другому — хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ (отриманий від О. В. Білінської). Для регенерації з новоутворень використовували живильне середовище MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л цукрози [11]. Пиляки експлантували на живильні середовища N<sub>6</sub> у чашки Петрі

( $\varnothing = 60$  мм) та культивували у термостаті при +25 °С. Новоутворення пересаджували на безгормональне живильне середовище MS із половинним складом макро- і мікросолей та культивували при освітленні та температурі +25–26 °С до утворення рослин-регенерантів.

### 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. Чіткого впливу на даний показник гелеутворювача, що застосовували в індукційному середовищі не виявлено (таблиця, рисунок).

**Таблиця.** Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* рису

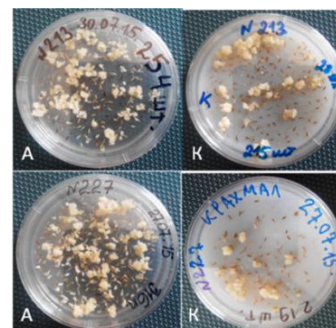
Гено-тип	Кількість пиляків	Індукційне середовище	Новоутворення		Зелені рослини-регенеранти	
			шт.	% від висаджених пиляків	шт.	% від висаджених пиляків
№ 202	3487	агар-агар	1816	52,1 ± 0,85	6	0,2 ± 0,07
	310	крохмаль	151	48,7 ± 2,84	0	–
№ 206	2581	агар-агар	945	36,6 ± 0,95	44	1,7 ± 0,25
	401	крохмаль	202	50,4 ± 2,50*	0	–
№ 212	5580	агар-агар	2308	41,4 ± 0,66*	23	0,4 ± 0,09
	367	крохмаль	106	28,9 ± 2,37	0	–
№ 213	4964	агар-агар	1598	32,2 ± 0,66	32	0,6 ± 0,11
	445	крохмаль	157	35,3 ± 2,27	0	–
№ 227	4455	агар-агар	1609	36,1 ± 0,72*	14	0,3 ± 0,08
	436	крохмаль	95	21,8 ± 1,98	0	–

Примітка: \* — достовірно при P < 0,01 (у межах номера між варіантами).

Так, два (№ 212 та № 227) з п'яти генотипів більше новоутворень формували на середовищі, де в якості гелеутворюючого агента застосовували агар-агар. Два інших генотипи (№ 202 та № 213) були не чутливі щодо заміни агару в індукційному середовищі на модифікований крохмаль Д-5аМ (рисунок). Лише гібрид Hashiri-moshi / Віконт (№ 206) позитивно відреагував на додавання крохмалю у середовище. Відсоток формування новоутворень в культурі пиляків цього гібриду був достовірно вищим за такий на живильному середовищі з агаром.

В роботі О. В. Білінської показано, що заміна агару на крохмаль стимулювала прямий ембріодогенез і позитивно впливала на частоту регенерації рослин [12]. Візуально калюси ячменю ярого, що формувалися на середовищі з кро-

хмалем Д-5аМ мали більш щільну структуру, не розпадалися на глобули та мали більшу регенераційну здатність.



**Рисунок.** Формування новоутворень в культурі пиляків рису № 212 та № 227 на індукційних середовищах: А — з агаром; К — з крохмалем Д-5аМ.

У нашому досліді калюси рису на обох варіантах індукційних середовищ за морфологією особливо не розрізнялись. І там і там формувались компактні глобулярні структури від білого до кремового кольору.

Здатність до регенерації новоутворень, одержаних на обох індукційних середовищах, була дуже низькою (від 0,17 до 1,70 %). Більша частина новоутворень усіх досліджених генотипів була не спроможна регенерувати зелені рослини. Невелику кількість регенерантів отримано лише з калюсів із середовища з агар-агаром, тоді як з калюсів, отриманих на індукційному середовищі з крохмалем — не отримано жодної зеленої рослини (таблиця).

Загалом за культивування 23026 пиляків, вилучених з колосся F<sub>2</sub> гібридів рису п'яти комбінацій схрещування, отримано 119 зелених рослин-регенерантів.

### Висновки

Шляхом андрогенезу *in vitro* із пиляків п'яти гібридів F<sub>2</sub> рису отримано 119 зелених рослин-регенерантів. Культивування пиляків рису на середовищі N<sub>6</sub> з хімічно модифікованим крохмалем D-5aM в якості гелеутворюючого агенту негативно впливає на здатність сформованих новоутворень до регенерації рослин.

### Перелік літератури

1. Thomas W. T. B., Forster B. P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding // Doubled haploid production in crop plants. — Dordrecht : Kluwer academic publishers, 2003. — P. 337–349.
2. Devaux P., Kasha K. J. Overview of barley doubled haploid production // Advances in haploid production in high plants / Ed. A. Touraev, B. P. Forster, S. J. Mohan. Springer Science + Business Media, 2009. — P. 47–64.
3. Замбріборщ І. С., Шестопап О. Л., Добрава Г. О., Шпак Д. В. Особливості андрогенезу *in vitro* міжсортних гібридів *Oryza sativa* L. української селекції // VIII Міжнарод. наук. конфер. «Фактори експериментальної еволюції організмів». — Алушта, 2013. — Т. 12. — С. 224–228.
4. Шестопап О. Л., Замбріборщ І. С., Ігнатова С. О., Шпак Д. В. Вплив попередньої обробки волотей на морфогенез в культурі пиляків *Oryza sativa* L. // Збірник наук. праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». — К., 2014. — С. 144–148.
5. Шестопап О. Л., Замбріборщ І. С., Шпак Д. В. Вплив вуглецевого компоненту живильного середовища на ефективність андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол. / В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2015. — Т. 17. — 2015. — С. 160–163.
6. Белинская Е. В., Дульнев П. Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — 39, № 2. — С. 136–143.

7. Белинская Е. В., Дульнев П. Г. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами // Физиология и биохимия культурных растений. — 2012. — 44, № 5. — С. 440–448.
8. Белинская Е. В., Тымчук С. М., Дульнев П. Г., ДЕРЕБИЗОВА О. Ю. Использование высокоамилозного крахмала в питательной среде для культивирования пыльников ячменя // Физиология и биохимия культурных растений. — 2009. — 41, № 6. — С. 539–546.
9. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae i su2*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія. — 2010. — Вип. 11 (№ 905). — С. 60–65.
10. Білінська О. В., Тимчук С. М., ДЕРЕБИЗОВА О. Ю. Штучне живильне середовище для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Патент України на винахід № 103426 від 10.10.2013. Бюл. № 19.
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, Vol. 1(2). — P. 69–76.
12. Білінська О. В., Дульнев П. Г. Вплив гелеутворюючого компонента живильного середовища на ефективність отримання гаплоїдів ячменю ярого (*Hordeum vulgare* L.) у культурі пиляків *in vitro*. // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.]. — К.: Логос, 2014. — С. 20–24.

Представлена Кунахом В. А.  
Надійшла 4.09.2016

### EFFECT OF MEDIUM GELATINIZED COMPONENT ON EFFECTIVENESS ANDROGENESIS *IN VITRO* *ORYZA SATIVA* L.

I. S. Zambriborshch<sup>1</sup>, O. L. Shestopal<sup>1</sup>, D. V. Shpak<sup>2</sup>, A. O. Dobrova<sup>1</sup>, S. O. Ignatova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Breeding & Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigation Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya 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

**Aims.** Study the effect of chemically modified starch D-5aM 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 of gellatyne source in culture medium on the processes of induction and regeneration in anther culture of rice were studied. The 119 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** The negative effect on the formation of green regenerants using a gel-forming components of the chemically modified starch D-5aM was shown.

**Keywords:** rice, anther culture *in vitro*, callus, regeneration, chemically modified starch.