

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

<sup>1</sup> Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства 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

## ОСОБЛИВОСТІ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* МІЖСОРТОВИХ ГІБРИДІВ *ORYZA SATIVA* L. УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Отримання гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків представляє альтернативу традиційним селекційним підходам з поліпшення найважливішої сільськогосподарської культури у світі – рису посівного (*Oryza* spp.). Головною перевагою використання гаплоїдів в селекції є створення гомозиготних ліній в короткий термін [1, 2]. Багато сортів та поліпшених селекційних ліній отримано на основі культури пиляків у Китаї, Кореї, Японії та США. У КНР за допомогою культури пиляків отримано понад 100 нових сортів рису [3]. На Філіппінах цим методом виведено сорт PSBRc50 [4]. Гаплоїди також є цінними для виявлення та виправлення небажаних рецесивних ознак, утворених в результаті мутацій [5] або гібридизації [6]. Як показано різни-

### Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F<sub>2</sub>: Світлий × УкрНКС 8000 (№112); Янтарь × Серпневий (№114); Престиж × Лідер (№118); Hashiri-moshi × Лідер (№123); Престиж × Віконт (№128), які вирощували в умовах рисових зрошувальних систем Інституту рису НААН (м. Скадовськ). Волоті зрізали, коли мікроспори (вакуолізовані) більшості пиляків знаходились на середньо-пізній стадії розвитку.

Попередньо зрізані волоті, які знаходилися у покривному листку, поміщали у воду, обгортали фольгою листя та поміщали у кліматичну камеру при температурі +8...+10°C на 4 – 8 діб.

Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у пиляках проводили шляхом приготування тимчасових мікропрепаратів пиляків, забарвлених оцетокарміном [11], під світловим мікроскопом. Волоті звільняли від покривного листка та поміщали у чашки Петрі діаметром 150 мм для стерилізації, яку проводили наступним чином: волоті заливали розчином комерційного препарату «Білізна» протягом 5 хв., злива-

### Результати та обговорення

За результатами проведеного дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F<sub>2</sub> рису, вирощеного у чеках Інституту рису

ми авторами, частота індукції у рису коливатиметься від 10 до 100% в залежності від генотипу [7]. Високий відсоток диплоїдних регенерантів із калусів у культурі пиляків рису – часте явище, яке є результатом спонтанної диплоїдизації гаплоїдів і відіграє важливу роль в одержанні гомозиготних рослин за короткий період. Методи отримання подвоєних гаплоїдів прискорюють цикл розмноження рису мінімум удвічі [8].

В Україні розробок у біотехнологічному напрямку з отримання подвоєних гаплоїдів із використанням культури ізольованих пиляків не проводили, хоча необхідність у цих роботах існує. Тому метою дослідження є вивчення особливостей андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. та розробка методів індукції ембріодогенезу.

ли його, додавали 0,05 н. розчин HCl (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою.

Для індукції новоутворень використали поживне середовище N6 за модифікацією Herath et al. [12] з додаванням регуляторів росту: 1-нафтилоцтова кислота (НОК) – 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) – 3 мг/л та кінетин 1 мг/л; і 50 г/л сахарози. Для новоутворень використали 2 варіанти поживних середовищ: середовище I – МС з додаванням 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л НОК; середовище II – МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК. Для регенерації використали поживне безгормональне середовище МС з половинним вмістом макро- та мікросолей.

Пиляки експлантували на поживні середовища у чашці Петрі діаметром 60 мм, закривали парафільмом та культивували у темряві при +25°C. Новоутворення пересаджували на відповідні середовища та культивували на світлі при +26°C.

НААН (м. Скадовськ), показана висока чутливість даних форм до створених умов культивування пиляків *in vitro*. Слід наголосити, що зна-

чний рівень, як формування новоутворень, так і регенерації з останніх був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій (табл. 1).

Слід зазначити, що на теренах України дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro* гаплоїдів рису розпочаті лише у 2011 році. Використання в роботі з гаплоїдії оригінальних напрацьованих методик дослідників з так званих «рисових» країн не є доцільним та результативним. Кліматичні відмінності нашого регіону зумовлюють специфічні умови вирощування рису в Україні, і як, наслідок – створення унікальних генотипів, пристосованих до нашого регіону. Отже, наші сорти і гібриди будуть по-іншому реагувати на надані у протоколах китайських

дослідників умови культивування пиляків *in vitro*, тому наші дослідження були спрямовані на модифікацію та адаптування відомих методик до наших умов.

За різними літературними джерелами, попередня обробка видалених з рослини волотей рису триває у воді від 5 до 14 діб за діапазону низьких позитивних температур +4...+10°C у темряві. У зв'язку з цим, з метою визначення оптимального строку попередньої обробки, ми витримували зрізані волоті у воді при +8...+10°C протягом 4 – 8 діб. Кожен день, починаючи з четвертого, висаджували пиляки на поживне середовище N<sub>6</sub> і оцінювали кількість отриманих новоутворень (рис. 1).

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* рису

Генотип	Кількість пиляків	середовище	Кількість новоутворень, шт.	Кількість рослин-регенерантів			
				зелених		альбіно	
				шт.	шт./ на 100 новоутворень	шт.	шт./ на 100 новоутворень
112	1790	1	358	96	26,82 ± 2,34	61	17,04 ± 2,58
		2	332	39	11,75 ± 1,77	32	9,64 ± 2,56
114	2427	1	267	74	27,72 ± 2,74	37	13,86 ± 2,95
		2	241	86	35,68 ± 3,09	31	12,86 ± 2,98
118	1489	1	497	103	20,93 ± 1,82	69	13,88 ± 2,07
		2	457	112	24,51 ± 2,01	52	11,38 ± 2,34
123	1367	1	225	59	26,22 ± 2,93	32	14,22 ± 3,11
		2	232	55	24,14 ± 2,81	52	22,41 ± 3,28
128	1344	1	304	81	26,64 ± 2,54	36	11,84 ± 2,75
		2	321	74	23,36 ± 2,36	53	16,51 ± 2,79

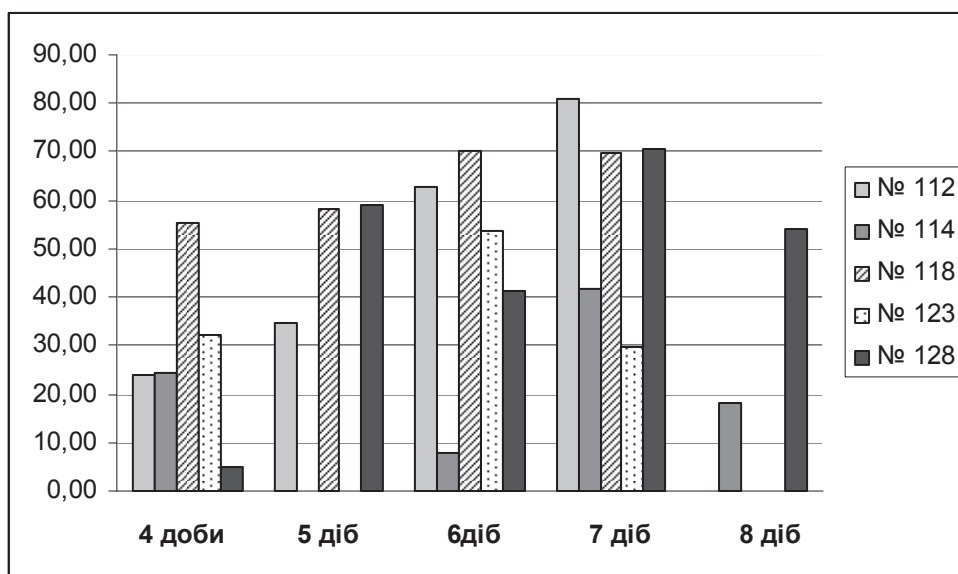


Рис. 1. Формування новоутворень (шт./100 висаджених пиляків) у культурі *in vitro* пиляків рису за різної тривалості попередньої холодової обробки волотей

Для всіх досліджених гібридів найбільший рівень новоутворень виявили у варіанті попередньої обробки волотей на 6 або 7 добу. Таким чином, виявлено, що за умов вирощування рису в Україні (можливо, для даних генотипів) найефективніше проводити 6–7 добу попередню обробку волотей.

Тестування двох запропонованих [13, 14] поживних середовищ для отриманих новоутворень і подальшої регенерації: МС з БАП та МС з кінетином показало, що обидва середовища сприяли регенерації як зелених, так і альбіносних рослин (рис. 2).

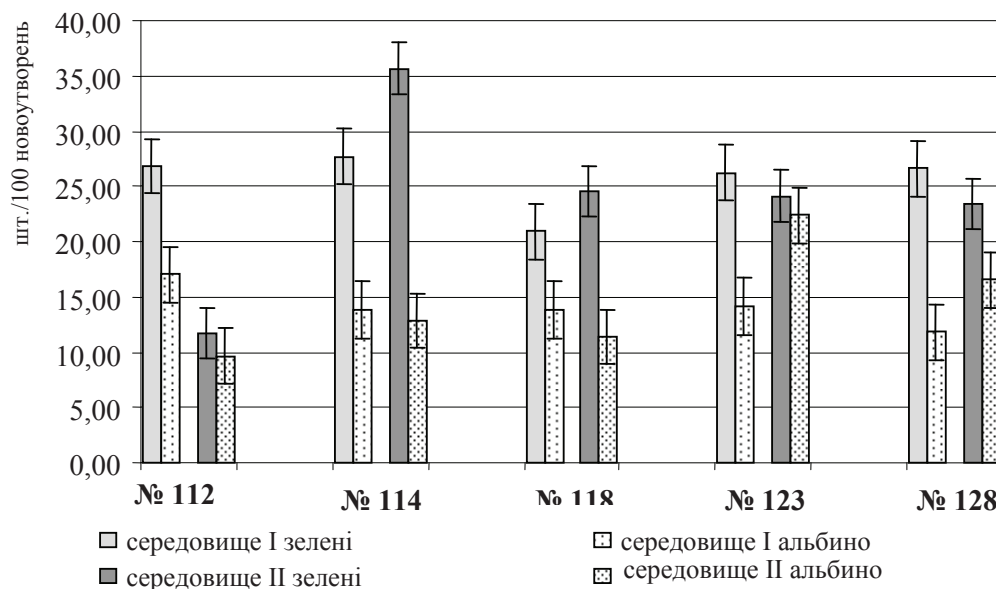


Рис. 2. Вплив поживного середовища на регенерацію рослин (зелених та альбіно) в культурі *in vitro* пиляків рису: середовище I – МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК; середовище II – МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК

Досить високий рівень регенерації зелених рослин спостерігали у всіх досліджених генотипів (від  $11,75 \pm 1,77$  до  $35,68 \pm 2,74$  шт. на 100 отриманих новоутворень). Однак, високою була й кількість отриманих альбіносних рослин ( $9,64 - 22,41$  шт./100 пиляків) (табл. 1, рис. 2). Надалі зелені рослини-регенеранти пересаджували на безгормональне поживне середовище МС з половинною концентрацією солей.

Аналіз отриманих даних (рис. 2) виявив, що середовище I є найбільш придатним для гібриду № 112, а середовище II – для № 114. Для

трьох інших – різниці між показниками регенерації зелених рослин не виявлено. Цікаво, що співвідношення рослин-регенерантів «зелені/альбіно», які отримані на одному середовищі для трьох гібридів вище для середовища I, а для двох інших – для середовища II (рис. 3).

Таким чином, на етапі культивування новоутворень для формування «точок регенерації» рослин доцільним є використання двох досліджених поживних середовищ з метою отримання максимальної кількості зелених рослин-регенерантів.

## Висновки

1. Шляхом андрогенезу *in vitro* із пиляків п'яти генотипів рису отримано 779 зелених рослин-регенерантів, які висаджені у ґрунт та передані для подальшої адаптації до умов *ex vitro* в Інститут рису (м. Скадовск). 2. Показано, що за наших умов вирощування рису для збільшення рівня формування новоутворень в культурі пиляків *in vitro* доцільно проводити 6-7 добу попередню обробку волотей у воді при  $+8...+10^{\circ}\text{C}$ .

3. Для культивування *in vitro* новоутворень рису з метою формування максимальної кількості зелених рослин-регенерантів від генотипів з невідомою гаплопродукційною здатністю слід одночасно використовувати два поживних середовища: МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК та МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК.

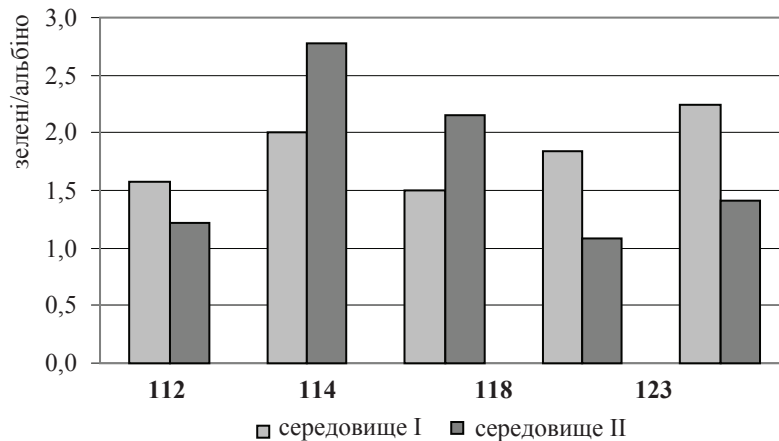


Рис. 3. Вплив складу поживного середовища на співвідношення утворених зелених та альбіносних рослин-регенерантів

### Література

1. Khush G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // *Plant Mol. Biol.* – 1977. – Vol. 35. – P. 25-34.
2. Zhu D.Y., Sun Z.X., Pan X.G., et al. Use of anther culture in hybrid rice breeding / *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium of Hybrid Rice.* – 1998. – Philippines. – Cap. 21. – P. 268-281.
3. Meifang L.I. Anther culture breeding of rice at the CAAS / 1992 In: K. Zheng and T. Murashige (eds.). – 1992. – P. 75-85.
4. Zhang Z.H., Chu Q.R. Advance in rice anther culture for varietal improvement in China // *J. Agric. China.* – 1986. – 2 Suppl. – P. 10-16.
5. 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. – Vol. 120. – P. 401-408.
6. He T., Yang Y., Tu S.B., Yu M.Q., Li X.F. Selection of Interspecific Hybrids for Anther Culture of Indica Rice // *Plan Cell, Tissue and Organ culture.* – 2006. – Vol. 86. – P. 271-277.
7. Wang C.C., Sun C.S., Chu C.S., Wu S.C. Studies on the albino pollen plantlets of rice // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press, Peking.* – 1978. – P. 149 – 160.
8. Maria A.M., Adriana S., Ana M.G. Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/deshydration Technique // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – Vol. 42. – P. 31-36.
9. Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T. A high density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population // *Genetics.* – 1998. – Vol. 148. – P. 479-494.
10. Змеева В. Н. Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно-полезных признаков в популяциях соматолонов и андрогенных дигаплоидов риса *Oryza sativa* L.: автореф. дисс... канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Биотехнология» / В. Н. Змеева. – Владивосток, 1995. – 27 с.
11. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений: учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 270 с.
12. 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. – Vol. 10. – P. 17-22.11.
13. Tala Gueye and Khadidiatou Ndoye Ndir *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // *Scientific Research and Essays.* – 2010. – Vol. 5, №7. – P. 709-713.
14. H.M.I. Herath, D.C. Bandara, P.K. Samarajeewa, D.S. A.Wijesundara Effect of low temperature pre-treatment on anther culture in selected indica, japonica rice varieties and their inter sub-specific hybrids // *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.).* – 2009. – Vol. 38, №1. – P. 11-16.

ZAMBRIBORSHCH I.S.<sup>1</sup>, SHESTOPAL O.L.<sup>1</sup>, DOBROVA H.O.<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

### THE FEATURES ANDROGENESIS IN VITRO OF INTERVARIETIES HYBRIDS OF ORYZA SATIVA L. FROM UKRAINIAN SELECTION

**Aims.** Testing morphogenetic potential of microspores in anther culture of F<sub>2</sub> hybrids by cultivation in South of Ukraine. **Methods.** Obtaining of rice double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical meth-

ods. **Results.** In anther culture of rice the sterilization conditions of explants, the optimal time were tailored. The culture media for callus induction and for subsequent regeneration was tested. The 779 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 8-10°C during 6-7 days. The simultaneous use of two culture media MC: 1) with the addition of 1 mg / l BAP and 0.5 mg / L NOC, 2) with the addition of 2 mg / l kinetin and 0.5 mg / L NAA promotes by formation of maximum number of green plants-regenerants.

*Key words:* rice hybrids, anther culture *in vitro*, double haploid.

**ЗАРДИНОВА Г.Р., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.**

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского  
Россия, 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ГИПОКОТИЛЯ РАЗНЫХ СОРТОВ УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*)**

Разработка системы регенерации и трансформации люпина, как одной из важных кормовых культур, в настоящее время является актуальной проблемой. Получение трансгенных форм люпина позволит в дальнейшем создать новые сорта, устойчивые к антракнозу – широко распространенному грибному заболеванию, которое значительно снижает урожайность люпина [1]. При этом успешная трансформация невозможна без разработки приемов культивирования *in vitro* и получения растений-регенерантов [2].

Решением проблемы регенерации люпина *in vitro* занимались российские и зарубежные ученые [2-11]. Исследовалось влияние различных гормонов и состава питательных сред на регенерацию люпина *in vitro*, изучался регенерационный потенциал различных типов эксплантов. Так, Daza & Chamber получили регенерацию жизнеспособных растений на эксплантах из гипокотилей люпина желтого [4]. В 1997 году Molvig с сотрудниками получили прямой стеблевой морфогенез из меристематических тканей незрелых зародышей люпина на модифицированной среде MS [5]. В работе Костюченко Д.А. (Брянская государственная инженерно-технологическая академия) показано положительное влияние гибберелловой кислоты на раз-

витие побегов и дальнейшее укоренение регенерантов люпина, предложены схемы введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей, верхушечных и пазушных почек трех видов люпина [6, 7]. В лаборатории молекулярной биологии Института проблем химической физики РАН был разработан метод клонального микроразмножения из пазушных почек проростков люпина узколистного на среде MS с концентрацией БАП 0,5 мг/л. Показано, что добавление ИМК в питательную среду на этапе размножения повышает эффективность ризогенеза микропобегов люпина после 3-6 пассажей [8].

Как и у многих бобовых, у люпина способность к регенерации *in vitro* во многом определяется генотипом, что является одной из причин низкой воспроизводимости разрабатываемых систем регенерации и трансформации. Наличие сортовой специфичности люпина при культивировании *in vitro* делает необходимым выявление сортов с наибольшим морфогенным потенциалом и объясняет актуальность оптимизации условий регенерации применительно к конкретным видам и сортам люпина.

В данной работе на сортах люпина узколистного селекции ВНИИ люпина нами изучено влияние экзогенных фитогормонов на регенерацию *in vitro* растений из ткани гипокотилей.

#### **Материалы и методы**

Работу проводили на 5 сортах люпина узколистного (*Lupinus angustifolius*): Белозерный 110, Кристалл, Снежень, Витязь, Смена. Семенной материал предоставлен ВНИИ люпина.

Для введения в культуру *in vitro* были использованы экспланты, изолированные из гипокотилей проростков люпина 3-4-дневного воз-

раста. Стерилизация исходного материала проводилась по следующей схеме: семена промывали проточной водой, затем их выдерживали 10 мин в концентрированной серной кислоте, что способствовало снятию твердокаменности семян и индукции прорастания, после чего семена промывали пятикратно стерильной дистиллиро-