

**І.С. Замбріборщ**

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,  
Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна,  
тел.: (0482) 39 55 57, e-mail: IZambriborsh@gmail.com

## **ДОСЛІДЖЕННЯ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* РИСУ (*ORYZA SATIVA L.*)**

*За результатами цитологічного моніторингу стадій розвитку пиляків та морфологічного розвитку рослин оцінено режим попередньої обробки донорного матеріалу перед експлантацією пиляків на поживне середовище. Досліджено різні варіанти стерилізації та добрано поживне середовище для культивування пиляків рису. Отримано калюсну культуру пиляків рису.*

*Ключові слова: рис посівний (*Oryza sativa L.*), пиляки, андрогенез, стерилізація, культивування *in vitro*.*

Рис посівний (*Oryza spp.*) є найважливішою сільськогосподарською культурою у світі. Отримання гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків представляють альтернативу традиційним селекційним програмам з поліпшення цієї культури. Головною перевагою використання гаплоїдів в селекції є створення гомозиготних ліній в короткий термін [1]. Проте, здатність рису до андрогенезу може бути поліпшена до введення в культуру як інструмент для селекції рослин [2].

У Китаї, за допомоги культури пиляків отримано понад 100 нових сортів рису [3, 4]. Гаплоїди є цінними для виявлення та виправлення небажаних рецесивних ознак, утворених в результаті мутацій [5] або гібридизації [6]. Методи отримання подвійних гаплоїдів прискорюють цикл розмноження і дозволяють краще досягти розрізнення між генотипом у будь-якому поколінні [7].

Однак, як показали дослідження, індукція андрогенного калюсу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* виявилася надзвичайно низькою, тоді як сорти рису підвиду *Japanica* є чуйними до умов *in vitro*. У рису, як показано різними авторами, частота індукції коливатиметься від 10% до 100% залежності генотипу [8]. У дигаплоїдних ліній виявлено достовірні відхилення для різних ознак, у порівнянні з вихідними [9].

В Україні розробок за цим біотехнологічним напрямом не проводили, хоча необхідність у цих роботах є. Метою роботи було вивчення



особливостей андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. та розробка методів індукції ембріогенезу.

### Матеріали та методи

Донорним матеріалом були рослини рису сортів Дебют (ранньостиглий), Преміум (середньостиглий), Агат (середньостиглий), Україна 96 (ранньостиглий), № 5 (пізньостиглий). Ці сорти рису відносяться до виду *O. sativa* L., *prol. Japonica*.

Попередньо волоті, які знаходилися у покривному листу, поміщали у воду з розчином солей за прописом Кнопа [10], обгортали фольгою та ставили у камеру при температурі + 7 та + 10 °С протягом 5 діб.

Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у пиляках проводили шляхом приготування тимчасових мікропрепаратів пиляків, забарвлених оцетокарміном [11], під світловим мікроскопом.

Волоті звільняли від покривного листа та поміщали у чашки Петрі діаметром 150 мм.

Для стерилізації експлантів використовували такі варіанти: 1. волоті залити 5 %  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  і витримувати протягом 5 хв., потім злити розчин та 3 рази промити стерильною дистильованою водою; 2. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 10 хв., злити його, додати 0,05 н. розчин  $\text{HCl}$  (10 хв.) з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 3. волоті залити 70% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 4. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 5. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв., 0,05 н. розчином  $\text{HCl}$  — 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 6. волоті опускають у 70% спирт протягом 30 с, з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 7. протирання покривних листів 96% етиловим спиртом.

Для експлантації пиляків використовували поживне середовище №6 з додаванням 1 мг/л кінетину, 1 мг/л нафтилоцтової кислоти, 3 мг/л 2,4-Д, 8 г/л агару, рН 5,8 [12]. Середовище розливали в чашки Петрі діаметром 60 мм. У кожену чашку висаджували пиляки з однієї волоті. Кількість пиляків коливалась від 40 до 60 шт. залежно від сорту рису, який досліджували. Пиляки культивували при температурі  $+27 \pm 1$  °С у темряві (термостат). Процес андрогенезу аналізували за ознакою — реакція пиляків на поживне середовище. Кількість новоутворень (індукцію) визначали у відсотках від загальної кількості пиляків. До новоутворень відносять зародкоподібні структури та калуси, які утворюються із молодих клітин пилку за умов *in vitro*.

## Результати досліджень та їх обговорення

### Цитологічні дослідження

Для введення в культуру *in vitro* використано пиляки донорних рослин *O. sativa* L., більша частина мікроспор у яких знаходилася переважно на вакуолізованій фазі розвитку (від ранньої до пізньої) [13, 14]. Більшість дослідників вважають цю фазу розвитку оптимальною для індукції розвитку мікроспор за спорофітною програмою при культивуванні пиляків в умовах *in vitro* і одержанні рослин-регенерантів.

Більша частина мікроспор, як у високочутливих, так і низькочутливих генотипів, у запропонованих умовах *in vitro* культивування пиляків до 3–4 доби культивування деградувала. У таких нежиттєздатних мікроспорах відзначали плазмоліз, деградацію, загибель клітин.

За подальшого культивування пиляків на 10–15 добу, від дати висадки пиляків на поживне середовище, відмічали формування морфогенних багатоядерних структур і пізніше, на 20–25 добу культивування, морфогенних багатоклітинних структур в середині пиляків.

Утворення калюсу спостерігали через 4–5 тижнів культивування. За зовнішнім видом виділено два типи калюсу — калюс, який нагадував грону винограду (неморфогенний), та компактний, біло-кремово кольору (морфо генний) (рис. 1). Після перенесення калюсу на поживне середовище для регенерації, часто спостерігали утворення нового калюсу у тій самій зоні, де він утворювався раніше. Калюси утворювалися на зовнішні некротичних пиляках (зовсім чорних), які виділяли в індукційне середовище феноли у достатньо великої кількості.

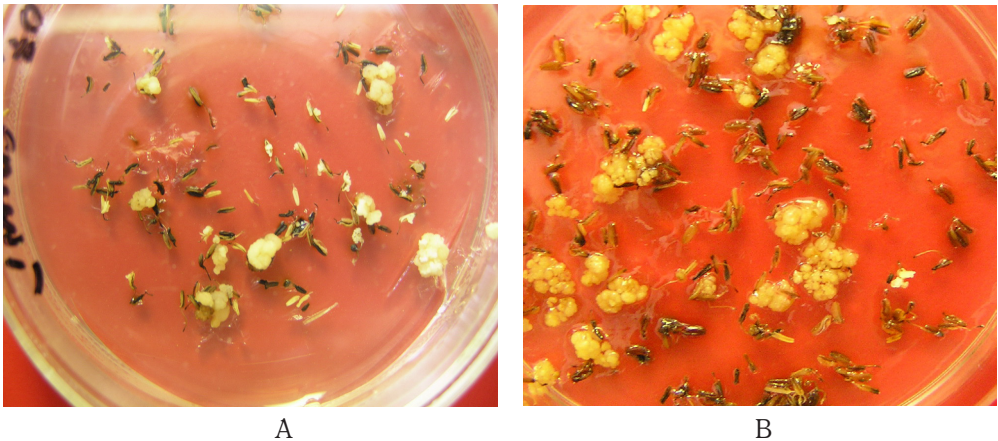


Рис. 1. Морфогенний (А) і неморфогенний (Б) калюс рису (збільшення x 20)

Fig. 1. Morphogenic (A) and nonmorphogenic (B) callus of rice (increased x 20)

Таким чином, для введення в культуру пиляків *in vitro* донорний матеріал відбирають, коли більша частина мікроспор знаходиться переважно на вакуолізованій фазі розвитку (від середньої до пізньої).

#### Стерилізація матеріалу

Донорний матеріал рису вирощували у чеках (м. Скадовськ). В процесі роботи виникла проблема контамінації дослідного матеріалу (бактеріальна і грибна інфекція), що було наслідком умов вирощування (у воді) та його доставки до лабораторії.

Всі зразки після обробки 1-м варіантом стерилізації (який використовують частіше) залишилися інфікованими. Ми застосували інші варіанти стерилізації експлантів. При варіантах 2, 3, 4, 5 (опис в матеріалах і методах) спостерігали, що пиляки виглядали життєздатними, але процент інфікування матеріалу також був високим.

При 6 варіанті стерилізації некроз був практично 100%, в той час як варіант 7 був самим нетравматичним для пиляків (вони зоставалися ніжно зеленим), хоча зараження матеріалу було високим.

Однак практично після всіх варіантів стерилізації спостерігалось утворення калюсу на експлантованих пиляках. На рис. 2 показано вплив стерилізації на індукцію новоутворень на пиляках на прикладі сорту Преміум. Найкращий для стерилізації виявився варіант 7 при цьому відсоток новоутворень склав 36,8% від висаджених пиляків, хоча рівень інфекції був досить великим. Варіант стерилізації 4 показав високий (35,6%) вихід новоутворень при цьому рівень зараження висадженого матеріалу був невеликим. Після обробок № 1 та № 6 увесь дослідний матеріал був інфікованим.

Таку картину спостерігали на всіх дослідних сортах рису Дебют, Преміум, Агат, Україна 96, № 5.

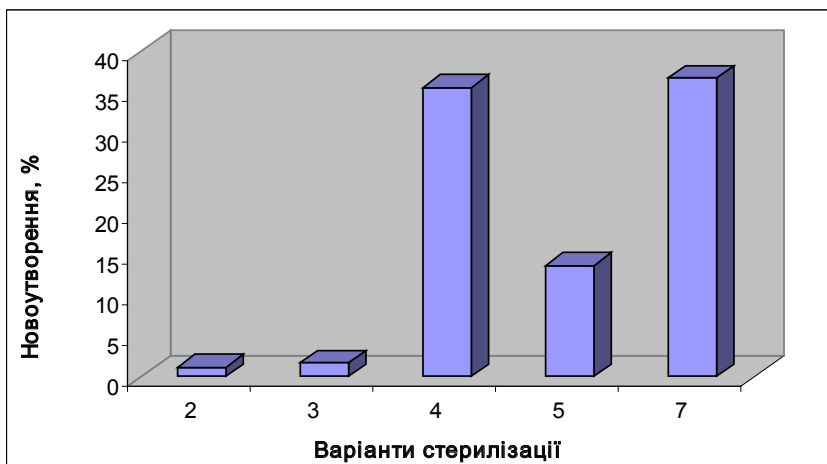


Рис. 2. Вплив варіантів стерилізації на індукцію пиляків на прикладі сорту Преміум (5 тижнів культивування)

Fig. 2. Effect of sterilization options upon induction of anther by example of the variety of Premium (5 weeks cultivation)

Таким чином, необхідним є подальший добір умов стерилізації матеріалу рису. З досліджених варіантів кращими виявилися варіант 4 (50% розчин комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою) та варіант 7 (протирання покривних листів 96% етиловим спиртом).

*Поживне середовище та індукція новоутворень*

Знижений рівень амонійного азоту зіграв вирішальну роль у виборі оптимального поживного середовища в основному для сортів підвиду *Japonica*. Розроблено середовище N6 [15] зі зниженим вмістом сульфату амонію та високим вмістом азотнокислого калію (яке обрано для наших досліджень). Проте знижений рівень амонійного азоту виявився невідповідним для сортів підвиду *Indica*. Для них розроблено модифіковане поживне середовище N6 [16], у якому сульфат амонію і фосфорнокислий калій повністю замінено фосфорнокислим амонієм.

На рис. 3 представлено дані що до чутливості досліджених сортів рису до культури пиляків *in vitro* при варіанті стерилізації 4. Треба відмітити, що всі сорти більшою чи меншою мірою чутливі до умов культури. За дослідженим показником сорти поділилися на дві групи. До першої групи відносяться сорти середньостиглі Преміум та Агат, які показали більше 35 відсотків новоутворень. До другої групи — сорти ранньо- та пізньостиглі, для яких відсоток новоутворень склав від 14,9 до 28,5.

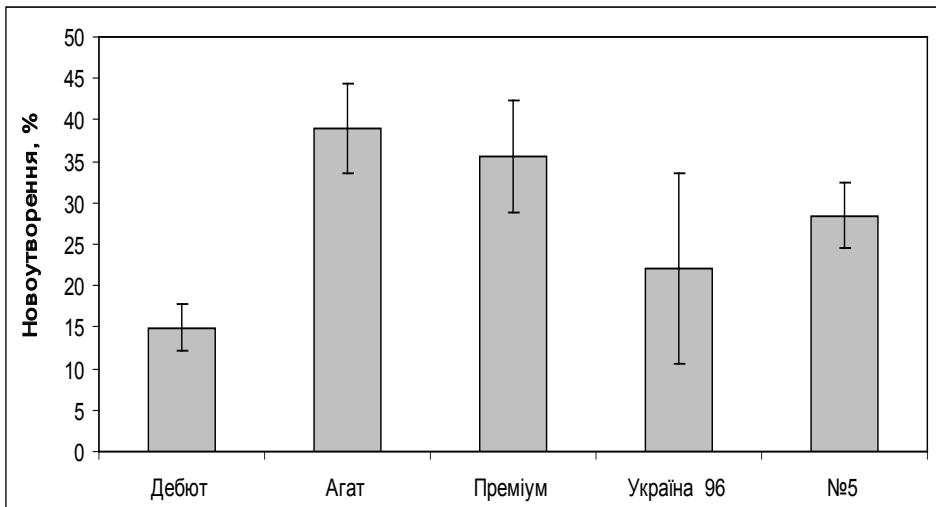


Рис. 3. Індукція новоутворень у сортів рису, що відрізняються за чутливістю до андрогенезу в культурі пиляків

Fig. 3. Induction of neoplasms in rice variety differ in sensitivity to androgenesis in anther culture

Таким чином, поживне середовище має велике значення у реакції експлантів на умови культури *in vitro*, але вирішальним є генетична схильність генотипу до запропонованих умов. Проте з удосконалення поживних середовищ та умов культивування є дуже важливими, для збільшення показників індукції новоутворень та подальшої з них регенерації зелених рослин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Khush G.S.* Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // *Plant Mol. Biol.* — 1977. — V. 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. — 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. — V. 86. — P. 271–277.
7. *Maria A.M., Adriana S., Ana M.G.* Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/deshydradation Technique // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* — 2006. — V. 42. — P. 31–36.
8. *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.
9. *Змеева В. Н.* Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно-полезных признаков в популяциях соматклонов и андрогенных дигаплоидов риса *Oryza sativa L.*: автореф. дисс... канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Биотехнология» / В. Н. Змеева. — Владивосток, 1995. — 27 с.
10. *Чесноков В.А. и др.* Выращивание растений без почвы. — Л. — 1960. — 360 с.
11. *Паушева З. П.* Практикум по цитологии растений : учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.
12. *Tala Gueye, 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.



13. Батыгина Т. Хлебное зерно: [атлас] / Татьяна Батыгина. — Л.: Наука, 1987. — 106 с.
14. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: автореф. дисс... д.б.н.: спец. 03.00.05 «Ботаника» / Н. Н. Круглова — Уфа, 2002. — 48 с.
15. Chu C.C. The N-6 medium and its application to anther culture of cereal crops // Proc. Symp. Plant Tissue Cult., Science Press., Peking.— 1978. — P. 45—50.
16. Jang X. R., Wang J. R., Li H. L., Li J. E. Studies on the general medium for anther culture of cereals and increasing of frequency of green pollen plantlets — induction of *Oryza sativa* snien // Acta Phytophysiol. Sin.— 1980. — Vol. 6. — P. 67—74.

### І.С. Замбріборщ

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины,  
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: +38 (0482) 39 55 57,  
e-mail: IZambriborsh@gmail.com

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* РИСА (*ORYZA SATIVA* L.)

### Реферат

По результатам цитологического мониторинга стадий развития пыльников и морфологического развития растений, оценено режим предварительной обработки донорного материала перед эксплантацией пыльников на питательную среду. Исследованы различные варианты стерилизации и подобрана питательная среда для культивирования пыльников риса. Получена каллусная культура из пыльников риса.

Ключевые слова: рис посевной (*Oryza sativa* L.), пыльники, андрогенез, стерилизация, культивирование *in vitro*.



**I.S. Zambriborchsh**

South Plant Biotechnology Center,  
3, Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine,  
e-mail: IZambriborsh@gmail.com

## **RESEARCH OF ANDROGENESIS IN VITRO OF RICE (*ORYZA SATIVA L.*)**

### **Summary**

According to the results of cytological monitoring of the development stages of anther and morphological development of the plants, there were evaluated the regime of pretreatment of the donor material before anthers planting on nutrient medium. There were researched the various options for sterilization and chosen medium for anther cultivation of rice. There were derived callus from anther culture of rice.

**Key words:** rice (*Oryza sativa L.*), anther culture, androgenesis, sterilization, cultivation *in vitro*.

