

О. Л. Шестопа́л¹, к.б.н., провідний науковий співробітник

І. С. За́мбріборщ¹, к.б.н., завідувачка лабораторією

Д. В. Шпа́к², к.с.-г.н., зав.відділом селекції

Т. Г. Алексе́єва³, к.б.н., доцент

О. А. Афіно́генов¹, інженер

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

²Інститут рису Української академії аграрних наук, с.Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл., 75705, Україна

³Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ОЦІНКА РЕГЕНЕРАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ГІБРИДНОГО МАТЕРІАЛУ РИСУ ПОСІВНОГО (*ORYZA SATIVA* L.)

Проведено тестування гаплопродукційного потенціалу у культурах пиляків п'яти гібридних популяцій F₃ рису *Oryza sativa* L. До культури *in vitro* було введено 30944 пиляків п'яти генотипів. Шляхом андрогенезу в культурі пиляків рису отримано 6542 новоутворень (21,14 ± 0,23 в середньому на 100 пиляків), які регенерували 539 зелених рослин (1,74 ± 0,07 в середньому на 100 пиляків). Найбільший регенераційний потенціал в культурі пиляків виявили у рослин гібридної популяції F₃ Labelle/Малиш (2,90 ± 0,17). На сучасний момент на етапі колосіння дорощуються 193 рослини-регенеранта (35,8 %).

Ключові слова: рис; андрогенез *in vitro*; калюс; регенерація.

В останні кілька десятиліть розробка методів *in vitro* для створення гаплоїдів було головним завданням у галузі біотехнології та селекції рослин. Можливість скорочення циклів розмноження та отримання повноцінних гомозиготних рослин робить цю технологію найкращою для створення сортів, картографування генома, QTL-картування, кількісної генетики, геноміки, ідентифікації генів, виявлення генів у трансгенних рослин [13]. Перспективність та результативність проведення робіт із створення лінійного матеріалу *Oryza sativa* L. шляхом андрогенезу *in vitro* на матеріалі Української селекції показана позитивними результатами наших попередніх (2011–2018 рр.) досліджень [1, 2, 6, 8, 9]. Розроблені прийоми до сих пір не гарантують отримання достатньої для досліджень кількості ліній генплазми різного походження. Проте, культура пиляків *in vitro* стала найважливішим інструментом для селекціонерів, використання якого дозволяє не лише скоротити час створення сортів рису, але й фіксувати цінні рекомбінації. Раціональне поєднання методів класичної селек-

ції з біотехнологічними методами дозволяє вирішувати поставлені завдання за коротший термін [3, 5, 7, 9].

Показники регенераційної здатності сильно змінюються в залежності від гібрида і від генотипу, тобто навіть в межах однієї гібридної комбінації різні рослини F_1 або F_2 забезпечують різну інтенсивність калусоутворення і регенерації зелених рослин: від дуже низької до дуже високої [13]. Таким чином, необхідно охоплювати максимально більшу кількість генотипів гібридних рослин для введення в культуру *in vitro*. Питання про те, яке покоління гібридів більш доцільно використовувати для культури пиляків *in vitro*, залишається дискусійним. В окремі роки гібридне потомство F_1 не дає калусоутворення; у цьому випадку для культури пиляків можливе використання тільки гібридів наступного покоління. Крім цього, у рослин рису з популяції F_2 частота калусоутворення вище, ніж у гібридів F_1 [11]. Метою цього дослідження була оцінка гаплопродукційної здатності мікроспор перспективних селекційних зразків рису посівного, що є носіями генів стійкості до пірикуляріозу, та отримання гомозиготних ліній з комплексною стійкістю до пірикуляріозу шляхом андрогенезу *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень

Як рослинний матеріал застосовували пиляки гібридних популяцій F_3 : Sirio/Маршал (№ 207), Sirio/YiP4970 (№ 211), Labelle/Малиш (№ 236), Labelle/Chise bind (№ 240), Brazos/Малиш (№ 242), які вирощували у «чеках» у м. Скадовськ. Дані гібридні популяції створені гібридизацією батьківських форм – носіїв різних генів стійкості до збудника пірикуляріозу (Малиш, Chise Bind – ген *Pi-ta*, Brazos, Labelle – ген *Pi-b*). Волоті зрізали, коли мікроспори більшості пиляків знаходилися на середньо-пізній стадії розвитку.

Попередньо зрізані волоті, які знаходилися у покривному листку, поміщали у воду, обгортали фольгою листя та поміщали у кліматичну камеру за температури +8–10 °C на 4–5 діб для попередньої обробки [6, 10, 12]. Волоті звільняли від покривного листка та поміщали у чашки Петрі діаметром 90 мм для подальшої стерилізації. Останню проводили таким чином – волоті заливали розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв., зливали його, додавали 0,05 н розчин HCl (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою стерильною водою. Пиляки асептично виділяли в умовах ламинар-боксу та експлантували у чашки Петрі ($\varnothing = 60$ мм) на тверді живильні середовища та культивували у темряві при +25 °C. Для індукції новоутворень використали поживне середовище N6 за модифікацією Herath et al. [10] з додаванням фітогормонів: НОК – 1 мг/л, 2,4-дихлорфенооцтова кислота (2,4-Д) – 3 мг/л та кінетик – 1 мг/л; і 60 г/л цукрози. Для подальшого культивування отриманих на первинному середовищі новоутворень використовували поживне середовище MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л мальтози [12]. Оскільки формування калюсу з мікроспор рису – це

процес тривалий та відбувається так званими «хвилями», новоутворення пересажували у 2 етапи (I етап – через 4–5 тижнів культивування пиляків; II етап – через 7–8 тижнів культивування) на відповідне поживне середовище та культивували при освітленні за температури +26 °С. Для культивування отриманих зелених регенерантів використовували поживне безгормональне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

Математичне опрацювання даних проводили, використовуючи комп'ютерні програми методів статистики та дисперсійного аналізу [4].

Результати досліджень та їх обговорення

За результатами дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридних популяцій F_3 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 досліджених гібридних комбінацій (табл. 1).

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

Гібрид	Кількість пиляків	Новоутворення		Зелені регенеранти		Альбіносні регенеранти	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
№ 207	4892	1715	35,06±0,68	103	2,11±0,219	11	0,22±0,07
№ 211	6430	411	6,39±0,31	13	0,20±0,06	0	0
№ 236	9329	2517	26,98±0,46	271	2,90±0,17	13	0,14±0,04
№ 240	4081	635	15,56±0,57	54	1,32±0,18	10	0,25±0,08
№ 242	6212	1264	20,35±0,51	98	1,58±0,16	27	0,43±0,08
НСР _{0,05}			1,80		0,57		0,22

Найбільш продуктивними щодо формування новоутворень на першому етапі гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків виявилися гібриди Sirio/Маршал (№ 207) та Labelle/Малиш (№ 236) – 35,06±0,68 та 26,98±0,46 відсотків від висаджених пиляків відповідно. Три інші гібриди – Brazos/Малиш (№ 242), Labelle/Chise bind (№ 240) і Sirio/УіР4970 (№ 211) – розподілились у порядку зниження величин даного показника.

У наших попередніх дослідженнях [2, 6, 9] показано, що зміна джерела вуглецю (з сахарози на мальтозу) у регенераційному живильному середовищі підвищує рівень виходу зелених рослин-регенерантів. Цього року ми також у дослідженні гаплопродукційної здатності наданих гібридів третього покоління застосовували винайдений спосіб отримання лінійного матеріалу рису посівного [6].

В результаті дослідження виявлено, що здатність до регенерації одержаних новоутворень була дуже різною. Більша частина новоутворень виявила спро-

можність регенерувати лише коріння (різогенез). Слід зазначити, що зелені рослини-регенеранти були отримані в культурі пиляків усіх п'яти гібридних популяцій рису, у той час як доля хлорофіл-дефектних рослин була незначною (рис. 1, 2). Невелика кількість альбіносних регенерантів є вагомим здобутком наших досліджень, оскільки саме значний відсоток альбіносних рослин серед регенерантів є одним з головних негативних факторів широкого застосування методу культури пиляків в селекції рису [14].

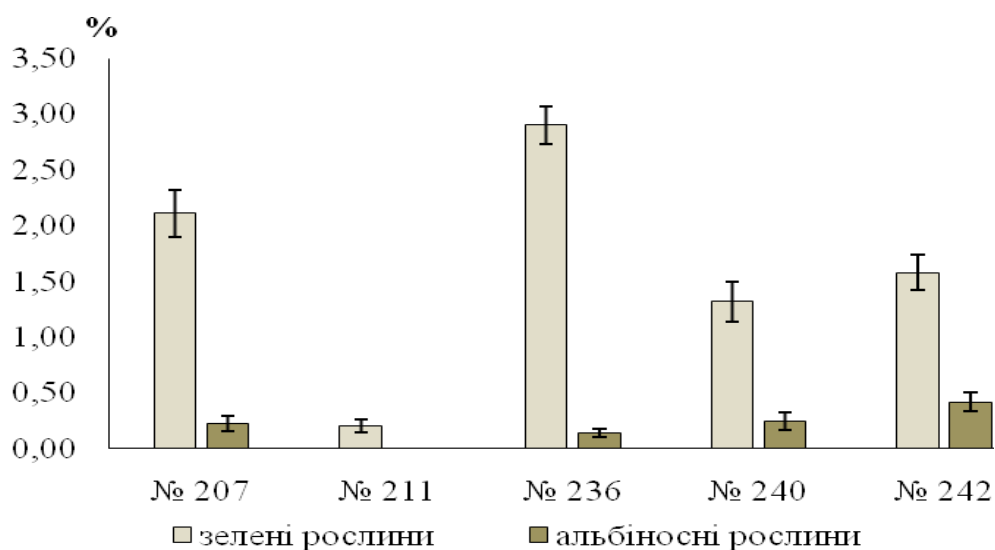


Рис. 1. Регенерація рослин в культурі пиляків рису (відсоток від висаджених пиляків)

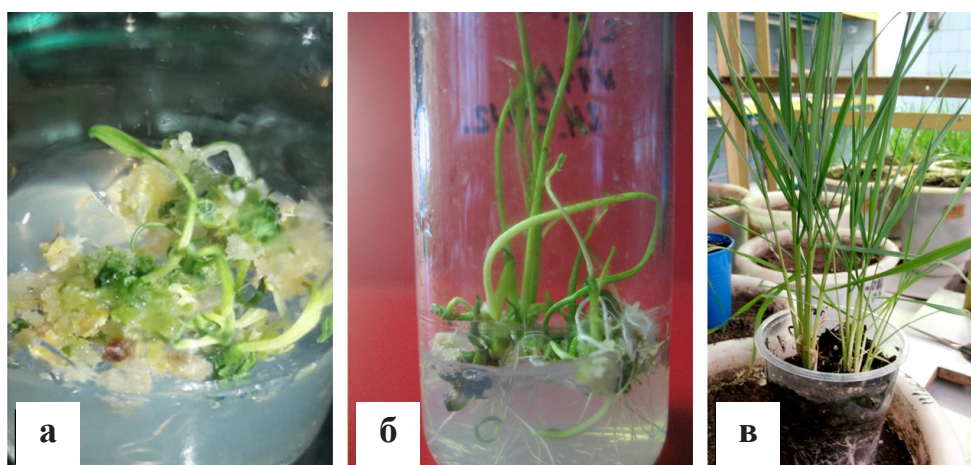


Рис. 2. Рослини-регенеранти: а) регенерація пагонів з калюсу в культурі пиляків рису; б) вкорінення регенерантів на живильному середовищі MS; в) адаптовані рослини у ґрунті

За величиною показника «регенерація зелених рослин» серед інших гібридів достовірно виділився генотип № 236 Labelle/Малиш – $2,90 \pm 0,17$ зелених рослин на сто висаджених пиляків. Етап регенерації рослин на даний час ще не завершений. Зелені рослини-регенеранти пересаджували на безгормональне живильне середовище MS з половинною концентрацією солей, а потім висаджували у ґрунт для адаптації до умов *ex vitro*.

Одним із найкритичніших етапів будь-якої біотехнології *in vitro* – це адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*. Саме на цьому етапі відбувається втрата до 60 відсотків рослин (рис. 3).

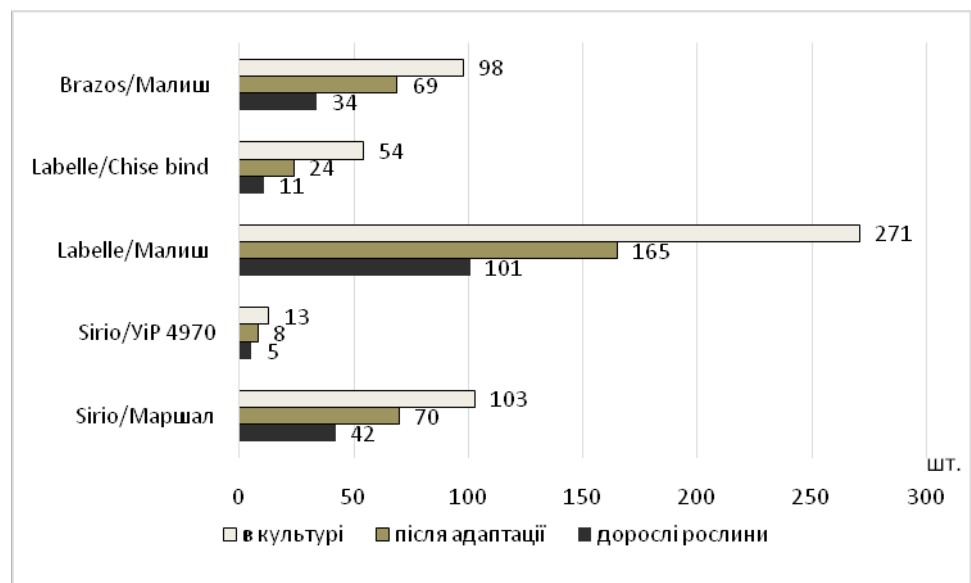


Рис. 3. Динаміка кількості рослин-регенерантів на різних етапах дорощування

Показано, що на етапі адаптації «живильне середовище – ґрунт» в середньому гине 37,7 % отриманих в культурі регенерантів. Однак, і серед адаптованих до ґрунту рослин не всі мають генетичні детермінанти, які дозволяють рослині проходити подальші етапи диференціації росту та розвитку до отримання насіння. Так, на наступних етапах дорощування рослин-регенерантів з різних причин (хромосомна (геномна) нестабільність, хвороби та ін.) гине в середньому до 40 % вже адаптованих рослин. Таким чином, приблизно третина (35,8 %) одержаних шляхом андрогенезу *in vitro* рослин-регенерантів рису посівного дасть насіннєве покоління, і цей факт неодмінно повинні враховувати дослідники ще на етапі планування експерименту.

Таким чином, застосування запатентованого способу отримання лінійного матеріалу рису [2] для тестування гібридних популяцій рису в культурі пиляків, забезпечує ефективний процес формування новоутворень і сприяє виходу достатньої кількості зелених регенерантів.

Висновки

1. Виявлена різноманітність досліджених гібридних популяцій за здатністю до андрогенезу

2. На дані умови *in vitro* найкраще реагували мікроспори у пиляках рослини гібридної популяції F₃ Labelle / Малиш (новоутворення – 26,98±0,46; регенерація зелених рослин – 2,90 ± 0,17 на 100 висаджених пиляків), найгірше – Sirio/УіР4970 (новоутворення – 6,39 ± 0,31; регенерація зелених рослин – 0,20±0,06 відповідно). Всього за п'яти комбінаціями схрещування отримано 539 рослин-регенерантів.

3. Серед усіх досліджених комбінацій гібридів F₃ найгірша виживаність регенованих зелених рослин на обох етапах (культура – адаптація до ґрунту та адаптація до ґрунту – виколошування) була властива комбінації Labelle/Chise bind (20,37 % і 45,83 % відповідно). Найвищі відсотки виживаності на обох критичних етапах мали гібриди Sirio/Маршал (40,78 % і 60,00 %) та Sirio/УіР4970 (38,46 % і 60,50 %).

Стаття надійшла до редакції 12.03.2020

Список використаної літератури

1. Замбрїборщ І. С. Створення *in vitro* вихідного селекційного матеріалу пшениці та рису / І. С. Замбрїборщ, О. Л. Шестопап, С. О. Ігнатова // Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин. – Одеса: Астропринт, 2016. – С. 139–148.
2. Замбрїборщ І. С. Использование метода гаплоидии (андрогенез *in vitro*) в селекционном процессе злаковых культур Юга Украины / И. С. Замбрїборщ, О. Л. Шестопап // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнологія: XI Междунар. конф.: тез. докл. – Минск, 2018. – С. 72–73.
3. Илюшко М. В. Изменчивость гаплоидов риса, полученных в культуре пыльников *in vitro* / М. В. Илюшко, М. В. Ромашова // Рос. сельскохоз. наука. – 2019. – № 2. – С. 11–14
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
5. Мальшева Н. Н. Получение, оценка и отбор дигаплоидных линий риса с хозяйственно-ценными признаками / Н. Н. Мальшева, Е. Г. Савенко, В. А. Глазырина, Л. А. Шундрина // Рисоводство, 2012. – Т. 21. – С. 14–18.
6. Пат. 108514 Україна, № u201512317 на корисну модель. Спосіб отримання ліній рису / Шестопап О.Л., Замбрїборщ І. С., Шпак Д. В.; заявл. 14.12.2015 ; опубл. 25.07.2016, Бюл. № 14. – 5 с.
7. Савенко Е. Г. Использование методов *in vitro* для получения исходного селекционного материала / Е. Г. Савенко, В. А. Глазырина, Л. А. Шундрина // Рисоводство, 2012. – Т. 20. – С. 13–16.
8. Шпак Д. В. Ранньостиглий селекційний матеріал рису, створений методом культури *in vitro* / Д. В. Шпак, І. С. Замбрїборщ, О. Л. Шестопап // Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин. – Одеса: Астропринт, 2016. – С. 174–180.
9. Шпак Д. В. Продуктивність та якість зерна ліній рису, створених з використанням методів культури *in vitro* / Д. В. Шпак, І. С. Замбрїборщ, О. Л. Шестопап // Біотехнологія — інноваційний шлях розвитку селекції рослин: Міжн. наук. конфер.: тез доп. – Одеса, 2018. – С. 150–151.
10. Herath H. M. I. Effect of culture media for another culture of indica rice varieties and hybrids of

- indica and japonica / H. M. I. Herath, D. C. Bandara, P. K. Samarajeewa // Tropical agricultural research & extension. – 2007. – V. 10. – P. 17–22.
11. Naik N. Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture / N. Naik, P. Rout, N. Umakanta, R. L. Verma, J. L. Katara, K. K. Sahoo, O. N. Singh, S. Samantaray // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2017. – P. 128: 679–689.
 12. Rukmini M. Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids –Ajay and Rajalaxmi / M. Rukmini, G. J. N. Rao, R. N. Rao // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2013. – Vol. 1(2). – P.69–76.
 13. Tripathy S. K. Anther culture in rice: progress and breeding perspective / S. K. Tripathy, D. Lenka, A. M. Prusti, D. Mishra, D. Swain, S. K. Behera // Applied Biological Research. – 2019. – Vol. 21(2). – P. 87–104.
 14. Tripathy S. K. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) / S. K. Tripathy, D. Swain, P. M. Mohapatra, A. M. Prusti, B. Sahoo, S. Panda, M. Dash, B. Chakma, S. K. Behera // Journal of Applied Biology & Biotechnology. – 2019. – Vol. 7(02). –P. 87–92.

**O. L. Shestopal¹, I. S. Zambriborshch¹, D. V. Shpak², T. G. Aliksieieva³,
O. A. Afinogenov¹**

¹Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation

Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska road 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

²Rice Research Institute at Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
Ukraine, 75705, Kherson region, Skadovsk district, Antonovka village,

³Odesa Mechnykov National University, Department of Genetics and Molecular Biology, 2 Dvoranska Street, Odesa, 65082, Ukraine

EVALUATION OF REGENERATION POTENTIAL OF RICE (*ORYZA SATIVA* L.) HYBRID MATERIAL

Abstract

Introduction. *In vitro* anther culture is an important source of linear material propagation for efficient breeding of rice (*Oryza sativa* L.), in particular due to the reduction of reproduction cycles and the production of homozygous plants. Given the strong variation in the regenerative ability of microspores in different hybrid combinations, it is desirable to cover the maximum number of combinations of hybrids of different generations.

Aim. Evaluation of the haploproduction ability of microspores of promising breeding samples of rice.

Methods. The anthers of five promising hybrid F₃ populations obtained at the Rice Institute (Skadovsk) as a result of hybridization of carriers of various resistance genes to pyriculariosis were used. The inflorescences with microspores at the mid-late stage of development were cut and pretreated for sterilization; the isolated anthers were explanted in Petri dishes on a solid nutrient medium and cultured in the dark until neoplasms were obtained, after which they were transplanted (stage I – after 4-5 weeks). The next transplant event (II stage – after 7-8 weeks) and further cultivation was carried out under lighting to obtain green regenerants.

Results. The high sensitivity to *in vitro* cultivation conditions was shown for five combinations of F₃ rice hybrids. The rate of callus formation varied from 6.4 % (Sirio / YiP4970) to 35 % (Sirio / Marshal). The ability to regenerate in the obtained neoplasms also varied greatly, since most of them were only capable of rhizogenesis, without forming shoots and leaves. Nevertheless, the regenerant plants were obtained for each hybrid combination and the proportion of albinos among the total number of regenerants was relatively small. On average about 40 % of the regenerants obtained in the culture die at the critical stage of adaptation of regenerated plants to *ex vitro* conditions; approximately the same number of plants die during the growing process, being unable to give seed generation.

Conclusions. The most productive from the point of view of plant formation adapted to *ex vitro* conditions was the hybrid population F₃ Labelle / Malish (101 adult plants), and the least productive was Sirio / YiP4970 (5 adult plants) among the studied combinations. Thus, by androgenesis in anther culture, 336 plants adapted to *ex vitro* conditions were obtained. At the moment, 193 plants are at the earing stage, which is 35.81% of the total number of green regenerants obtained in the culture.

Key words: rice, androgenesis *in vitro*, callus, regeneration

References

1. Zambriborshch I. S., Shestopal O. L., Ihnatova S. O. (2016) “Creation of initial selection material of wheat and rice *in vitro*”, *Agricultural biotechnology: theoretical developments and implementation in plant breeding* [“Stvorennia *in vitro* vykhidnoho selektsiinoho materialu pshenytsi ta rysu”, Silskohospodarska biotekhnolohiia: teoretychni rozrobky i vprovadzhenia v selektsiui roslyn], Odesa, p. 139-148.
2. Zambryborshch Y. S., Shestopal O. L. (2018) “The use of the method of haploidy (androgenesis *in vitro*) in the selection process of cereals in the South of Ukraine”, *Biology of plant cells in vitro and biotechnology* [“Yspolzovanye metoda haploydy (androgenez *in vitro*) v selektsyonnom protsesse zlakovykh kultur Yuha Ukrainy”, XI Mezhdunar konf «Byolohyia kletok rastenyi invitro y byotekhnolohyia)], Minsk, pp. 72-73.
3. Ilyushko M. V., Romashova M. V. (2019) “Variability of rice haploids obtained in anther culture *in vitro*” [“Yzmenchyvost haploydov rysa, poluchennikh v kulture pilnykov *in vitro*”], *Russian Agricultural Sciences*, 2, pp. 11-14.
4. Lakyn H. F. (1990) *Biometrics* [Byometryia], Moscow, 350 p.
5. Malysheva N. N., Savenko E. G., Glazyrina V. A. Shundrina L. A. (2012) *Receiving, assessment and selection of dihaploid rice lines with economic and valuable signs* [“Poluchenye, otsenka y otbor dyhaploydnikh lynyi rysa s khoziaistvenno-tsennimy pryznakamy”], *Rice growing*, 21, pp. 14-18.
6. Pat. 108514 Ukraine, № u201512317 for utility model. The method of rice lines obtaining [Sposib otrymannia linii rysu], Shestopal O. L., Zambryborshch I. S., Shpak D. V.; claimed 14.12.2015; publ. 25.07.2016, Bul. № 14. - 5 p
7. Savenko E.H., Hlazieryna V.A., Shundryna L.A. (2012) “Use of *in vitro* methods to obtain the original breeding material” [“Yspolzovanye metodov *in vitro* dlia poluchenyia yskhodnoho selektsyonnoho materyala”], *Rice growing*, 20, pp. 13-16.
8. Shpak D. V., Zambriborshch I. S., Shestopal O. L. (2016) “Early-maturing breeding material of rice, created by *in vitro* culture”, *Agricultural biotechnology: theoretical developments and implementation in plant breeding* [“Rannostyhlyi selektsiinyi material rysu, stvorenyi metodom kultury *in vitro*”, Silskohospodarska biotekhnolohiia: teoretychni rozrobky i vprovadzhenia v selektsiui roslyn], Odesa, p. C. 174-180.

9. Shpak D. V., Zambriborshch I.S., Shestopal O. L. (2018) "*Productivity and grain quality of rice lines created using in vitro culture methods*", *Biotechnology - an innovative way to develop plant breeding*, ["Produktyvnist ta yakist zerna linii rysu, stvorenykh z vykorystanniam metodiv kultury in vitro", Biotekhnolohiia —innovatsiinyi shliakh rozvytku selektsii roslyn], Odesa, pp.150-151.
10. Herath H. M. I., Bandara D. C., Samarajeewa P. K. (2007) Effect of culture media for another culture of indica rice varieties and hybrids of indica and japonica, *Tropical agricultural research & extension*, 10, p. 17–22.
11. Naik N., Rout P., Umakanta N., Verma R L, Katara J. L., Sahoo K. K., Singh O. N., Samantaray S. (2017) Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128, 679-689.
12. Rukmini M., Rao G. J. N., Rao R. N. (2013) Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids –Ajayand Rajalaxmi, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1(2), pp. 69-76.
13. Tripathy S. K., Lenka D., Prusti A. M., Mishra D., Swain D. and Behera S.K. (2019) «Anther culture in rice: progress and breeding perspective», *Appl.Biol.Res.*, 21(2), pp 87-104.
14. Tripathy S. K., Swain D., Mohapatra P. M., Prusti A. M., Sahoo B., S. Panda, Dash M., Chakma B., Behera S. K. (2019) Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(02), pp. 87-92.