

**Conclusions.** The optimum compositions of regenerative medium for each variety were defined. Explants of Langedijker and Kharkivska zymova will be used for the further genetic transformation experiments.  
**Key words:** *Brassica oleracea* L., regeneration, explants, fungicide.

УДК 602.6:58:633.181.1

ШЕСТОПАЛ О.Л.<sup>1</sup>, ЗАМБРІБОРЩ І.С.<sup>1</sup>, ІГНАТОВА С.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

## ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ ВОЛОТЕЙ НА МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *ORYZA SATIVA* L.

За результатами наших попередніх (2011–2012 рр.) досліджень андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. [1, 2] показана перспективність та результативність проведення даних робіт в умовах Півдня України. Перевага методів культури *in vitro* над прийомами традиційної селекції стосується, насамперед, отримання гомозиготного лінійного матеріалу в значно короткий термін [3, 4]. Подальший розвиток досліджень андрогенезу *in vitro* рису можливий у напрямку збільшення числа подвоєних гаплоїдів серед рослин-регенерантів та підвищення адаптивного потенціалу останніх. Показано, що індукція андрогенного калюсу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* надзвичайно низькі, на відміну від подібних показників у сортів підвиду *Jaronica*. У рису, як показано різними авторами, частота індукції коливатиметься від 10 % до 100 % в залежності від генотипу [5]. Мета дослідження – вивчити вплив різних варіантів попередньої обробки волотей рису на процеси індукції та регенерації в культурі пиляків рису.

### Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F<sub>2</sub>: Преміум х УкрНДС 7761 (№ 103); Агат х Віконт (№ 106); Агат х Аметист (№ 114); Адмірал х Хазар (№ 128); Рапан х Україна 96 (№ 131), які вирощували в рисових чеках Інституту рису (м. Скадовськ). Волоті зрізали, коли мікроспори у пиляках знаходились на стадії середньо-пізньої вакуолізації. Зрізані волоті, у покривному листку, поміщали у воду та водний розчин абсцизової кислоти (АБК) і зберігали 3–7 діб у кліматичній камері за температури + 6 °С – + 8 °С. Волоті, звільнені від покривного листка, поміщали у чашки Петрі (150 мм). Стерилізацію проводили розчином комерційного препарату

«Білизна» протягом 5 хв. Надалі зливали дезінфікуючий засіб і додавали 0,05 н розчин НСІ (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою водою.

Для індукції новоутворень використовували живильне середовище N<sub>6</sub> за модифікацією Herath [6] з додаванням фітогормонів: 2,4-Д – 3 мг/л, НОК – 1 мг/л, кінетин – 1 мг/л і 60 г/л цукрози. Для культивування новоутворень використовували живильне середовище – МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Для регенерації рослин – живильне безгормональне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

Пиляки експлантували на живильне середовище N<sub>6</sub> у чашки Петрі (ш 60 мм) та культивували у термостаті при + 25 °С. Новоутворення пересаджували у 2 етапи (I етап – через 4–5 тижнів культивування пиляків; II етап – через 7–8 тижнів культивування) на дане живильне середовище та культивували при освітленні та температурі + 26 °С.

### Результати та обговорення

Проведено дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F<sub>2</sub> рису, показана висока чутливість даних форм до наданих умов культивування пиляків *in vitro*. Слід зазначити, що значний рівень, як формування новоутворень, так і регенерації з них, був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій (табл. 1), однак він мав нижчі показники в порівнянні з тогорічними результатами [2, 7].

Слід зазначити, що в нашій лабораторії (єдине місце на теренах України) дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro* гаплоїдів рису проводяться з 2011 року. Наші дослідження спрямовані на модифікацію та адаптування оригінальних напрацьованих

методик андрогенезу рису дослідників з інших країн, оскільки кліматичні відмінності нашого регіону зумовлюють специфічні умови вирощування рису в Україні, і як, наслідок – створення унікальних генотипів.

За результатами нашого дослідження 2012 р. виявлено, 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°C у темряві. За даними літератури [8, 9] мінімальний строк попередньої обробки – від трьох до п'яти діб, а витримування при цьому донорного матеріалу у водному розчині АБК (0,5 мг/л) підвищує показники гаплопродукції. У зв'язку з цим, ми витримували зрізані волоті у воді (контроль) та у розчині АБК при + 8–10 °С протягом 3 і 7 діб. Надалі висаджували пиляки на живильне середовище і оцінювали кількість отриманих новоутворень (рис. 1).

Найбільший рівень новоутворень

виявлено у гібриду Рапан х Україна 96 (№ 131) за попередньої обробки волотей 3 доби у воді. Показано, що для двох досліджених гібридів (№ 103 та № 131) варіант тридобової холодової попередньої обробки волотей у воді виявився кращим за семидобову, а для № 106, № 114 та № 128 – навпаки.

Вплив АБК, що застосовували на етапі передобробки, на вихід новоутворень виявився неоднозначним. Гібрид F<sub>2</sub> Преміум х УкрНДС 7761 незалежно від тривалості попередньої обробки показав однаково високий рівень формування новоутворень, тоді як гібрид F<sub>2</sub> Агат х Віконт (№ 106) кращий результат показав на контрольному варіанті за семидобової холодової обробки волотей. Виявлено різкий негативний вплив на частоту формування новоутворень тривалої 7-добової холодової обробки волотей у розчині АБК (0,5 мг/л); зниження даного показника у гібридів F<sub>2</sub> за номерами 114, 128, 131 відбувалось у декілька разів (рис. 1).

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

Генотип	Кількість пиляків	Варіант обробки	Кількість новоутворень		Кількість рослин-регенерантів			
			шт.	шт. / на 100 пиляків	зелених		альбіно	
					шт.	шт. / на 100 новоутворень	шт.	шт. / на 100 новоутворень
103	5096	К	1819	35,69 ± 0,67	5	0,27 ± 0,12	12	0,66 ± 0,19
	6817	АБК	3670	53,84 ± 0,60	42	1,14 ± 0,18	1	0,03 ± 0,03
106	5778	К	2218	38,39 ± 0,64	2	0,09 ± 0,06	0	0
	6341	АБК	1867	29,44 ± 0,57	40	2,14 ± 0,34	4	0,21 ± 0,11
114	3613	К	749	20,73 ± 0,67	13	1,74 ± 0,48	2	0,27 ± 0,19
	3956	АБК	1258	31,80 ± 0,74	25	1,99 ± 0,39	3	0,24 ± 0,14
128	1431	К	77	5,38 ± 0,60	1	14,29 ± 3,99	3	3,90 ± 2,21
	4675	АБК	905	19,36 ± 0,58	7	0,77 ± 0,29	0	0
131	2268	К	1519	66,98 ± 0,99	0	4,61 ± 0,54	13	0,86 ± 0,24
	2141	АБК	216	10,09 ± 0,65	3	1,39 ± 0,80	0	0

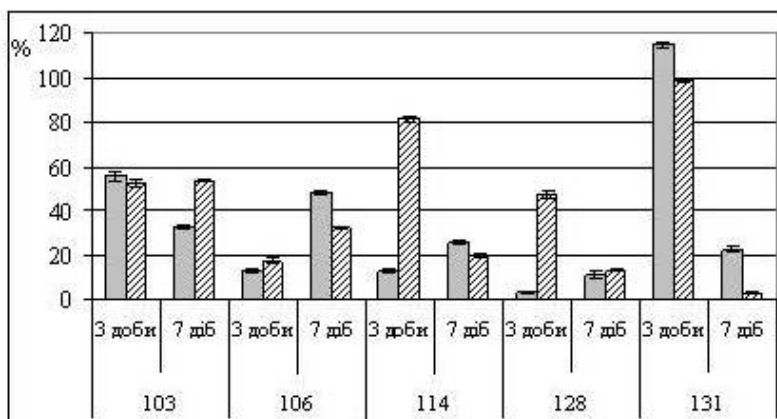


Рис. 1. Формування новоутворень (% від висаджених пиляків) в культурі пиляків рису за різних варіантів попередньої холодової обробки волотей : ■ – вода, ▨ – АБК

Слід зазначити, що за тридобової холодової попередньої обробки волотей рису у розчині АБК рівень формування новоутворень трьох гібридів був достовірно вищим за контрольний варіант, а у інших гібридів – на рівні контролю. Подальшу регенерацію з отриманих новоутворень проводили на поживному середовищі MS з гормонами [10]. Показано, що обидва варіанти передобробки сприяли регенерації як зелених, так і альбіносних рослин (табл. 2). Особливість процесу формування новоутворень в культурі пиляків рису: макроструктури формуються протягом тривалого часу (від одного до трьох місяців). Перший «збір врожаю» новоутворень відбувається на 25–30 добу культивування (рис. 2).

За подальшого культивування пиляків, через 3–4 тижня формуються нові новоутворення. За літературними даними та багатрічним особистим досвідом щодо отримання

регенерантів в культурі пиляків злаків (пшениця, ячмінь), морфогенний потенціал «пізніх» новоутворень є вкрай низьким відносно новоутворень «першого строку». Тому, одним із завдань нашого дослідження було вивчення регенераційного потенціалу двох «хвиль» сформованих новоутворень (табл. 2).

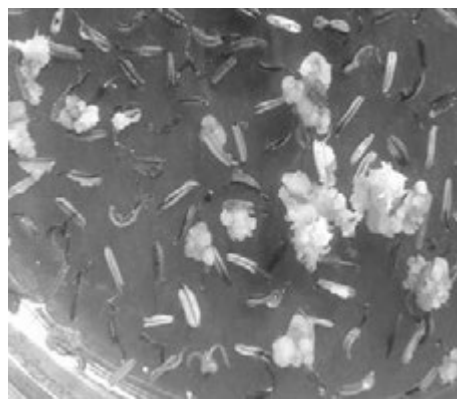


Рис. 2. Новоутворення на пиляках рису

Таблиця 2. Вплив передобробки та швидкості формування новоутворень на регенерацію в культурі *in vitro* пиляків рису

Генотип	Обробка волотей		Новоутворення, шт.		I строк				II строк			
	діб	розчин	I строк	II строк	Зелені		альбіно		Зелені		Альбіно	
					шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень
103	3	К	190	210	5	2,6 ± 1,2						
		АБК	165	257	16	9,7 ± 2,3	1	0,6 ± 0,6				
	7	К	654	765			10	1,5 ± 0,5			2	0,3 ± 0,2
		АБК	1417	1831	23	1,6 ± 0,3			3	0,2 ± 0,1		
106	3	К	200	0								
		АБК	60	133	3	5,0 ± 2,8	1	1,7 ± 1,7	27	20,3 ± 3,5	3	2,3 ± 1,3
	7	К	559	1459					1	0,1 ± 0,1		
		АБК	1011	663	11	1,1 ± 0,3						
114	3	К	61	117	2	3,3 ± 2,3						
		АБК	307	318	6	2,0 ± 0,8			9	2,8 ± 0,9		
	7	К	179	392	9	5,0 ± 1,6	2	1,1 ± 0,8				
		АБК	171	462					12	2,6 ± 0,7	3	0,6 ± 0,4
128	3	К	15	15	9	60,0 ± 12,6						
		АБК	150	248								
	7	К	20	27					2	7,4 ± 5,0	3	11,1 ± 6,0
		АБК	103	404	7	6,8 ± 2,5						
131	3	К	1015	243	50	4,9 ± 0,7			7	2,9 ± 1,1	5	2,1 ± 0,9
		АБК	3	156								
	7	К	41	220					13	5,9 ± 1,6	8	3,6 ± 1,3
		АБК	57	0	3	5,3 ± 3,0						
Середнє	К	2934	3448	75	2,6 ± 0,3	12	0,4 ± 0,1*	23	0,7 ± 0,1	18	0,5 ± 0,1*	
	АБК	3444	4472	69	2,0 ± 0,2	2	0,06 ± 0,04	51	1,1 ± 0,2	6	0,13 ± 0,1	

Примітка: \* відмінності порівняно з контролем достовірні при  $P < 0,05$ .

Регенерацію зелених рослин спостерігали у всіх досліджених генотипів: від 0,1 до 60,0 шт. на 100 отриманих новоутворень (табл. 2). Однак кількість отриманих альбіносних рослин була значно нижчою порівняно із тогорічними результатами: 0,03–3,90 шт./100 новоутворень (табл. 1) у 2013 р. проти 9,64–22,41 шт./100 новоутворень у 2012 р.[2].

Аналізуючи отримані дані (табл. 2) виявити достовірний вплив варіанту тривалості попередньої холодової обробки на регенерацію зелених рослин не вдалося. Щодо впливу АБК, виявлено достовірно менший відсоток регенерації альбіносних регенерантів ніж у контрольному варіанті як для регенерації з першої хвили новоутворень, так і з другої. Цікаво, що при передобробці волотей з АБК мікроспори довше зберігають свій морфогенний потенціал і здатність формувати морфогенний

калюс, з якого надалі регенерують зелені рослини (рис. 3).

Таким чином, використання на етапі попередньої холодової обробки волотей розчину абсцизової кислоти (у концентрації 0,5 мг/л) в середньому позитивно впливає на процес формування новоутворень і сприяє низькому виходу альбіносних рослин-регенерантів серед достатньої кількості зелених регенерантів.

#### Висновки

У культурі *in vitro* пиляків рису посівного отримано 218 зелених рослин-регенерантів. Використання на етапі попередньої холодової обробки волотей розчину абсцизової кислоти (у концентрації 0,5 мг/л) в середньому позитивно впливає на процес формування новоутворень і сприяє низькому виходу альбіносних рослин-регенерантів за достатньої кількості зелених регенерантів.

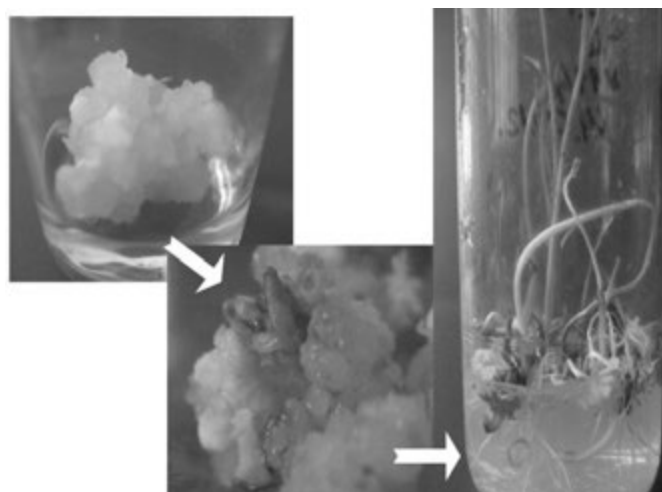


Рис. 3. Регенерація зелених рослин в культурі пиляків рису

#### Література

1. Замбріборщ І.С. Дослідження андрогенезу *in vitro* рису (*Oryza sativa* L.) // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – № 1, № 13. – С. 78–85.
2. Замбріборщ І.С., Шестопал О.Л., Добрава Г.О., Шпак Д.В. Особливості андрогенезу *in vitro* міжсортних гібридів *Oryza sativa* L. української селекції // VIII Міжнар. наук. конфер. «Фактори експериментальної еволюції організмів». – Алушта, 2013. – 12. – С. 224–228.
3. Wang Li, Lin Gang, Zhao D, Wang F., Chen J. Tissue Culture System for Different Hybrid of Indica Rice // Journal of Northeast Agricultural University (English Edition). – 2011. – 18, N 2. – P. 13–17.
4. 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. – 148. – P. 479–494.
5. 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.
6. 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.
7. Замбріборщ І.С., Добрава Г.О., Паламарчук А.І. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями // Міжнародна наукова конференція «Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи» (до 100-річчя Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення), 17–19 жовтня 2012 р. – Одеса: СГІ-НЦНС УААН, 2012. – С. 370–371.

8. Rokhshana K., Shahinul I., Israt Ara, Narendra T., Bari M.A. Effect of cold pretreatment and different media in improving anther culture response in rice (*Oryza sativa* L.) in Bangladesh // *Indian J. of Biotech.* – 2012. – 11. – P. 458–463.
9. 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.
10. Tala G., Khadidiatou N. *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. – 5, N 7. – P. 709–713.

**SHESTOPAL O.L.<sup>1</sup>, ZAMBRIBORSHCH I.S.<sup>1</sup>, IGNATOVA S.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, 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*

#### **EFFECT OF PANICLE PRETREATMENT ON MORPHOGENESIS IN ANTHOR CULTURE *ORYZA SATIVA* L.**

**Aims.** Study of the influence pretreatment of panicle on morphogenic potential of microspores 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.

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

**UDC 581.5+57.04**

**SAKHNO L.O.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,*

*Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

#### **SEED INTERFERON IMBIBITION LEADS SEEDLING GROWTH ENHANCEMENT ACCOMPANYING BY INCREASE IN SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY**

Interferons (INFs) are proteins induced in the genome of vertebrates by viruses, double-stranded RNA, and some other agents [1]. It was shown unfractionated human leukocyte INF, as well as highly purified subspecies of this INF (alpha and beta), and a purified recombinant of human leukocyte INF produced in bacteria was active in suppressing multiplication of tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf discs [2]. INF-gamma application increased cytokinin activity and induced synthesis of pathogenesis-related and heat shock proteins in tobacco and wheat (*Triticum aestivum* L.) tissues [3]. Human INFs (alpha, beta, and gamma) antiviral activities were shown in datura *Datura stramonium* L. infected by TMV and globe amaranth *Gomphrena globosa* L. inoculated by potato virus X [4]. Some

studies were conducted for *inf* gene expression in plants to obtain ones with improved virus tolerance [5]. Numerous researches were focused to produce recombinant INFs in plants [6]. But INF effects did not investigate at whole plant level under non-stress conditions.

In animal cells exogenous INF-alpha application is accompanied by superoxide radical formation and superoxide dismutase (SOD) activity increasing. Thus, preincubation of intact human neutrophils with INF-alpha and subsequent stimulation with calcium ionophore A23187 significantly enhanced superoxide radical generation that reduced nitroblue tetrazolium into blue formazan [7]. Mouse (L, L929, L1210 S6, and L1210 R3) and a human (WISH) cell lines pretreated with homologous INF and different