

СОДЕРЖАНИЕ ЯДЕРНОЙ ДНК У РЕГЕНЕРАНТОВ РИСА (*Oryza sativa* L.), ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *in vitro**М.В. ИЛЮШКО¹, М.В. СКАПЦОВ², М.В. РОМАШОВА¹

Рис — одна из важнейших продовольственных культур юга Дальнего Востока, поэтому необходимо выведение новых сортов с повышенной урожайностью и качеством зерна. В рисосеющих странах мира, в том числе в России, для ускорения селекционного процесса и создания нового исходного материала успешно применяется культура пыльников *in vitro*. В ней используют метод проточной цитометрии для разделения фракций регенерантов на гаплоидные, дигаплоидные и полиплоидные растения. Цитологические исследования растений в культуре клеток и тканей *in vitro* свидетельствуют о существовании не только геномных изменений от гаплоидов до гексаплоидов, но и хромосомных, приводящих к анеуплоидии и эндополиплоидии. В этом случае размер генома не может быть постоянной величиной. Цель работы заключалась в характеристике популяции регенерантов риса, полученных в культуре пыльников *in vitro*, по содержанию ядерной ДНК методом проточной цитометрии и оценке эффективности сочетания методов культуры тканей и проточной цитометрии в селекционной работе с рисом. Гибрид F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato), полученный в Приморском НИИСХ, выращивали на вегетационной площадке в 2014 году. Перед введением в культуру *in vitro* пыльники риса подвергали воздействию низких положительных температур (5 °С) в течение 7 сут, помещали метелку в цилиндр с водой. Для введения в культуру пыльники помещали на индукционную питательную среду N₆ с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,0 мг/л). Регенеранты с развитой корневой системой пересаживали в горшочки и продолжали выращивать в условиях культуральной комнаты до образования семян. По морфологическим признакам все регенеранты (1099 шт.) разделили на пять групп: гаплоиды (стерильные растения с очень мелкими цветками); дигаплоиды (растения с семенами); тетраплоиды (растения с очень крупными немногочисленными семенами, выраженным килем и ребристостью на цветочной чешуе); растения без семян (формировали цветки нормального размера, но не образовывали семена на двух и более метелках); растения, погибшие на ранних этапах роста и развития. Содержание ДНК определяли у 176 регенерантов с использованием метода проточной цитометрии. Группа растений без семян характеризовалась высоким коэффициентом вариации по содержанию ядерной ДНК — 32 %. Сюда, вероятно, вошли растения с двойным набором хромосом, триплоиды, тетраплоиды и пентаплоиды. В этой группе наблюдалось явление эндополиплоидии. Пять растений показали двувещинность при детекции изолированных ядер в зонах гаплоидов и диплоидов, 23 растения характеризовались содержанием ядерной ДНК, близким к таковому у дигаплоидных регенерантов (в среднем 2,00 пг). Явление анеуплоидии, характерное для культуры пыльников риса *in vitro*, очевидно, привело к некрому изменению в хромосомных наборах, которое было несовместимо с продукцией семян. Группы дигаплоидов и тетраплоидов оказались малоизменчивы (10,5 и 5,3 %), и средние значения содержания ядерной ДНК в них составляли соответственно 1,88 и 3,75 пг. Гаплоидные растения характеризовались высокой изменчивостью (29 %) при среднем содержании ядерной ДНК 0,89 пг. Таким образом, метод проточной цитометрии можно использовать в селекции риса для выделения тетраплоидных регенерантов (в совокупности с показателем продуктивности), а также для выбраковки гаплоидов с целью исключения этапа выращивания в условиях *ex vitro* бесперспективных регенерантов.

Ключевые слова: *Oryza sativa* L., культура пыльников *in vitro*, проточная цитометрия, гаплоид, дигаплоид, тетраплоид.

Рис — одна из важнейших продовольственных культур на юге Дальнего Востока России (1). Почвенно-климатические условия здесь отличаются от условий юга России, где находятся основные посевные площади риса. Ближайшие соседние провинции Китая, достигшие значительных успехов в селекции риса, применяют рассадные технологии с существенной долей ручного труда, что отличает их от технологии возделывания риса, принятой в России (2). Из-за этого и сорта западных регионов России, и китайские трудно позаимствовать для выращивания в Приморском крае. В Государственном реестре селекционных достижений РФ по 12-й зоне представлены только сорта риса дальневосточных селекционеров (<http://www.gossort.com>),

* Работа частично поддержана грантом «Программа фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» № 15-1-6-005.

поэтому реализацию программ по сознанию сортов риса для Дальнего Востока России необходимо продолжать.

Для ускорения селекционного процесса и создания нового исходного материала успешно применяется культура пыльников *in vitro* (3, 4). Ряд сортов риса выведен этим методом в нашей стране (5). Методы биотехнологии в селекции риса использовались и на Дальнем Востоке (6), в том числе проводятся исследования с целью создания сортов риса с применением культуры пыльников *in vitro*, в частности отработаны основные элементы технологии андроклиной гаплоидии для дальневосточных сортов и гибридов риса (7). По разным оценкам, 29-72 % регенерантов риса, полученных в культуре пыльников *in vitro*, оказываются продуктивными дигаплоидами (3, 8-10). Именно они представляют селекционную ценность. Остальные (до 60 %) — бессемянные регенеранты, чаще гаплоиды, которые либо отбраковываются, либо нуждаются в манипуляциях по удвоению хромосомных наборов. Для идентификации типа регенеранта в основном используют морфологические признаки: гаплоидные растения риса характеризуются меньшими размерами вегетативных органов, повышенной кустистостью, мелкими цветками и стерильностью (11). Перед идентификацией проводят рутинную процедуру выращивания регенерантов, доведения до стадии цветения и созревания семян.

Метод проточной цитометрии в исследовании растений получил широкое распространение относительно недавно (12). В культуре пыльников *in vitro* его используют главным образом для разделения фракций регенерантов на гаплоидные, дигаплоидные, триплоидные растения и т.д. (13). Приводятся данные о четком кратном увеличении наборов хромосом, значение пика каждого из наборов рассматривается как константная величина (13-16). Цитологические исследования растений в культуре клеток и тканей *in vitro* свидетельствуют о существовании не только геномных вариаций от гаплоидов до гексаплоидов (3, 4, 11, 17, 18), но и хромосомных изменений, приводящих к анеуплоидии (3, 12, 18, 19) и эндополиплоидии (12, 20). В этом случае размер генома не может быть постоянной величиной.

В настоящей работе впервые описаны параметры изменчивости содержания ядерной ДНК в различных группах регенерантов риса посевного, полученных в культуре пыльников *in vitro* (гаплоидов, удвоенных гаплоидов, тетраплоидов и негаплоидных бессемянных форм).

Цель работы заключалась в характеристике популяции регенерантов риса, полученных в культуре пыльников *in vitro*, по содержанию ядерной ДНК методом проточной цитометрии и оценке эффективности сочетания этих приемов в селекционной работе с рисом.

Методика. Гибрид F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato), полученный в Приморском НИИСХ, выращивали на вегетационной площадке в 2014 году.

Перед введением в культуру *in vitro* пыльники риса подвергали воздействию низких положительных температур (5 °С) в течение 7 сут, поместив метелку в цилиндр с водой. Затем пыльники помещали на индукционную питательную среду N₆ (21) с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,0 мг/л) и культивировали в темноте при температуре 25-27 °С до образования каллусов размером 1-5 мм. Для вторичной дифференцировки побегов каллусы переносили на среду N₆ с сахарозой (6 %), 6-бензиламинопурином и кинетином (по 1 мг/л) и культивировали при освещенности 4000 лк, температуре 22-25 °С и фотопериоде 16/8 ч. Для укоренения регенерантов использовали среду Мурасиге-Скуга (MS) с половинным минеральным составом макросолей в вариации Ю.К. Гончаровой (18).

Регенеранты с развитой корневой системой высаживали в горшочки и продолжали выращивать в условиях культуральной комнаты (4000 лк, температуре 22–25 °С и фотопериоде 16/8 ч) до образования семян. По морфологическим признакам все регенеранты разделяли на пять групп: гаплоиды (стерильные растения с очень мелкими цветками); дигаплоиды (растения с семенами); тетраплоиды (растения с очень крупными немногочисленными семенами, выраженным килем и ребристостью на цветочной чешуе); растения без семян (формировали цветки нормального размера, но не образовывали семена на двух и более метелках); растения, погибшие на ранних этапах роста и развития. Листья подвергали лиофильной сушке и хранили в морозильной камере при температуре –80 °С.

Содержание ДНК определяли с помощью проточной цитометрии. Использовали от одного до четырех гаплоидных и дигаплоидных растений от каждой каллусной линии, 52 бессемянных растения, не относящихся к гаплоидам, и 10 тетраплоидов — всего 176 растений. Лиофильно высушенные листья (1–2 см²) измельчали при помощи лезвия в чашке Петри с 1 мл охлажденного Трис-MgCl₂ буфера, содержащего 0,2 М Трис-основание, 4 мМ MgCl₂ · 6H₂O (Россия) и 0,5 % Triton X-100 с добавлением β-меркаптоэтанола (1 мкл/мл) («Serva», Германия), 50 мкг/мл йодида пропидия («Biotium», США) и 50 мкг/мл РНКазы («Синтол», Россия) (22). Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану CellTrics с размером пор 50 мкм («Systmex Europe GmbH», Германия). В качестве внешнего стандарта использовали изолированные с помощью Трис-MgCl₂ буфера ядра *Ficus benjamina* L. с известным содержанием ДНК 2С = 1,07 пг (23). Среднее значение (M) пика стандарта регистрировали трижды в день исследования, затем усредняли для дальнейших расчетов. Среднее значение (M) пика образца регистрировали в одной повторности при одинаковых для образца и стандарта настройках цитофлуориметра (напряжения на фотоумножителе), использовали пик не менее чем с 1000 детектируемых частиц. Данные флуоресценции изолированных ядер регистрировали на проточном цитофлуориметре Partec CyFlow PA («Partec GmbH», Германия) с лазерным источником излучения (λ = 532 нм). Сигналы записывали в логарифмическом представлении результатов флуоресценции (логарифмическая шкала) (24).

Данные обрабатывали в программе Statistica 10.0 («StatSoft, Inc.», США). В таблицах представлены средние (M) и стандартные ошибки средних (±SEM). Гистограммы относительного содержания ДНК строили с использованием программного обеспечения Flowing Software 2 («Perttu Terho», Финляндия) при стандартных настройках с определением количества событий (ядер), коэффициента вариации (Cv, %), среднего значения (M) и медианы пика (Me). Для определения достоверности различий между средними значениями содержания ядерной ДНК в группах использован *t*-критерий Стьюдента, коэффициент корреляции и *t*-критерий рассчитывали при уровне значимости 5 %.

1. Каллусообразование и регенерация в культуре пыльников у растений F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) in vitro

Показатель	Значение
Число инокулированных пыльников, шт.	240
Каллусообразование, %	37,5
Число высаженных каллусов, шт.	90
Каллусы с регенерантами, шт/%	72/80
Каллусы с зелеными регенерантами, шт/%	39,0/43,3
Число зеленых регенерантов на каллус, шт.	14,9

Результаты. Частота каллусообразования в культуре пыльников у изученного гибрида составляла 37,5 % (табл. 1). Некоторые пыльники начинали формировать каллус очень рано — через 18 сут после инокуляции. При еженедельном

переносе каллусных агрегатов на регенерационную среду за 6 нед получалось до пяти-шести пассажей. Все они рассматривались в нашем опыте как единый каллус. Однако на некоторых пассажах каллуса, например на первом и третьем, иногда не формировались зеленые почки, а на других образовывались зеленые регенеранты. При этом на каллусе одного пассажа могли быть только гаплоидные регенеранты, на другом — удвоенные гаплоиды. Чаще всего встречались каллусные агрегаты с разным сочетанием зеленых регенерантов: дигаплоиды и гаплоиды; дигаплоиды, тетраплоиды и погибшие растения.

2. Характеристика групп регенерантов, полученных у растений F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) в культуре пыльников *in vitro*

Показатель	Гаплоиды	Дигаплоиды	Тетраплоиды	Растения без семян	Погибшие растения
Всего, шт.	348	494	10	58	189
Число регенерантов на каллус, шт.					
<i>M</i>	9,2	13,0	0,3	1,5	5,0
±SEM	12,1	26,5	0,7	4,0	6,6
Доля от общего числа регенерантов, %	31,7	45,0	0,9	5,3	17,2
Максимальное число регенерантов на каллус, шт.	45	126	3	22	32

Каллусы сформировали 1099 зеленых регенерантов (табл. 2). После определения содержания ядерной ДНК оказалось, что у трех растений, отнесенных к дигаплоидам, оно соответствовало характерному для тетраплоидам (3,78; 3,83; 3,86). Также были обнаружены два бессемянных растения с маленьким геномом, как у гаплоидов (1,34; 1,05), и три гаплоида с содержанием ДНК, близким к таковому у диплоидных растений (2,13; 2,16; 2,05). Для характеристики популяции регенерантов риса эти растения были отнесены соответственно к тетраплоидам, гаплоидам и бессемянным растениям. Ошибка при отнесении регенерантов к нужной фракции растений по морфологическим признакам составила 4,5 %.

3. Содержание ядерной ДНК в популяции регенерантов риса, полученных у растений F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) в культуре пыльников *in vitro*

Показатель	Гаплоиды	Дигаплоиды	Тетраплоиды	Растения без семян
Число растений, шт.	61	50	13	52
Содержание ДНК, пг:				
<i>M</i>	0,887	1,881	3,752	3,046
±SEM	0,033	0,028	0,055	0,135
min	0,606	1,438	3,442	1,717
max	1,636	2,188	4,197	4,380
<i>C_v</i> , %	29,0	10,5	5,30	32,0
Относительно среднего значения у гаплоидов		2,12	4,23	3,43

Примечание. *C_v* — коэффициент вариации; 1 пг ДНК = 978 млн п.н. (29). Различия между средними значениями содержания ядерной ДНК в группах достоверны при *p* = 0,05.

Группа растений без семян характеризовалась высокой вариабельностью по содержанию ДНК в ядрах клеток (*C_v* = 32 %) (табл. 3). Сюда, вероятно, вошли растения с двойным набором хромосом, триплоиды, тетраплоиды и пентаплоиды (рис. 1). В этой группе регенерантов наблюдалась эндополиплоидия (рис. 2, В), которая характеризуется пиком диплоидных ядер (2×), пиком тетраплоидных ядер (4×), совмещенных с пиком G₂ стадии митоза диплоидных ядер и пиком G₂ стадии митоза тетраплоидных ядер (25, 26). При детекции изолированных ядер пять растений имели двувёршинность в зонах гаплоидов и диплоидов (см. рис. 2), 23 растения — набор хромосом, близкий к таковому у дигаплоидных регене-

рантов (в среднем 2,00). Явление анеуплоидии, характерное для культуры пыльников риса *in vitro* (18), привело к некратному изменению в хромосомных наборах регенерантов, что не позволило растениям сформировать семена. В группах дигаплоидов и тетраплоидов варьирование было незначительным (см. табл. 3). Среди дигаплоидов обнаружили один эндополиплоидный регенерант. В целом наши данные сопоставимы с результатами других авторов, согласно которым содержание ядерной ДНК в основном наборе хромосом у риса *O. sativa* варьирует от 0,91 до 1,00 пг (27, 28).

Гаплоидные растения характеризовались высокой изменчивостью по содержанию ядерной ДНК ($Cv = 29\%$). Максимальные значения у гаплоидов были выше минимальных значений у дигаплоидов. С.И. Малецкий с соавт. (29), изучая изменчивость растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), тоже обнаружили более высокую эпипластомную и эпигеномную нестабильность у гаплоидных геномов по сравнению с дигаплоидами.

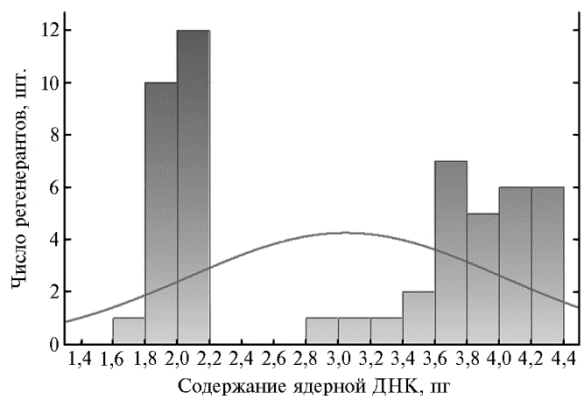


Рис. 1. Содержание ядерной ДНК у бессемянных негаплоидных регенерантов, полученных у растений F_2 (УкраНИИС 3435 × Укр 96) риса посевного (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) в культуре пыльников *in vitro*. Кривая — нормальное распределение.

Гаплоидные растения, полученные из одной каллусной линии, различались габитуально. Вначале формировались сильные, высокие растения с крупными метелками и значительным числом стерильных цветков. Последние сформированные растения были карликовыми с единичными цветками на короткой метелке.

В культуре пыльников *in vitro* жизнеспособность гаплоидов и дигаплоидов объясняется количеством «вредных» генов, которые им достались в результате мейоза

(30). Хромосомные изменения, происходящие при культивировании *in vitro* каллусов и регенерантов (3, 18-20), приводят к изменениям в морфотипе растений и их жизнеспособности. Погибшие на ранних стадиях развития растения были, вероятно, гаплоидами, в генотипе которых содержалось много летелей, полuletелей и субвителей (30). Отношение средних значений содержания ядерной ДНК у дигаплоидов и гаплоидов не было кратно двум (см. табл. 3). Это может косвенно свидетельствовать о потере некоторых участков хромосом у гаплоидов в процессе культивирования, которая привела к изменениям в морфотипе регенерантов.

Мы не обнаружили зависимости между продолжительностью культивирования (до 6 мес) и отклонением от среднего количества ядерной ДНК у гаплоидов ($r = -0,09$ при $p = 0,05$). Отношение средних значений содержания ядерной ДНК тетраплоидов и дигаплоидов равнялось двум. Вероятно, продуктивные тетраплоиды возникали посредством кратного увеличения числа хромосом основного набора, но даже в этом случае формировали небольшое число семян — от одного до пяти. По данным С.С. Гученко (персональное сообщение), все тетраплоиды R_1 взошли, развились, два из них образовали метелку, но были стерильны. Среди бессемянных растений 23 имели содержание ДНК, характерное для тетраплоидов (см. рис. 1), но при этом оказались стерильными. Низкая фертильность пыльцы связана со значительными цитологическими изменениями у

аутотетраплоидного риса (31).

Как показано в нашей работе и некоторых зарубежных публикациях, метод проточной цитометрии достаточно точен для выявления анеуплоидных растений. Тем не менее, исследованные анеуплоидные растения в основном имели значительный размер генома с крупными хромосомами (22, 32). У большинства цитофлуориметров стандартная ошибка измерения — 2,5-5,0 %. Средний размер хромосомы для *O. sativa* ~ 0,04 пг, что находится в пределах ошибки цитофлуориметров, тогда как, например, для *Triticum aestivum* L. средний размер — ~ 0,82 пг, для *Lolium perenne* L. — ~ 0,39 пг (33, 34). Следовательно, в дополнение к технике проточной цитометрии при изучении анеуплоидии растений с небольшими геномами лучше применять методы микроскопии.

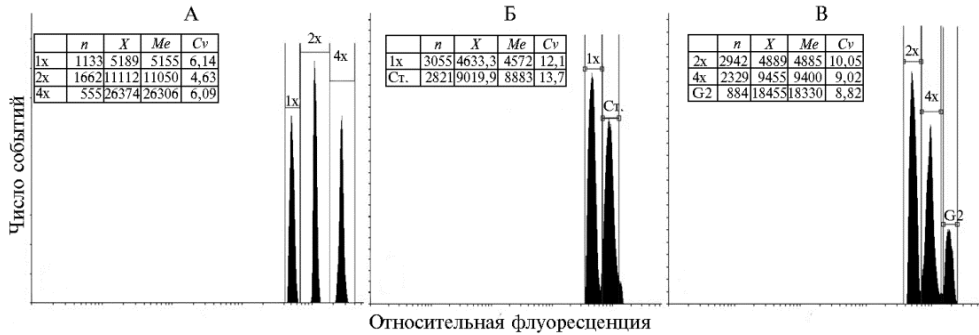


Рис 2. Образцы гистограмм, построенных при исследовании плоидности и относительного содержания ДНК у регенерантов, полученных у растений F₂ (УкрНИИС 3435 × Укр 96) риса посевого (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) в культуре пыльников in vitro: А — консенсусная гистограмма регенерантов с плоидностью 1×, 2× и 4×, Б — гистограмма, содержащая пики регенеранта с плоидностью 1× и стандарта (Ст.), В — образец гистограммы эндополиплоидного регенеранта; n — число событий, M — среднее пика, Me — медиана пика, Cv — коэффициент вариации, %.

Таким образом, у групп стерильных растений риса (гаплоиды и бессемянные негаплоиды), полученных в культуре пыльников in vitro, содержание ядерной ДНК варьирует в значительных пределах, тогда как у фертильных регенерантов (дигаплоиды и тетраплоиды) оно стабильно. Метод проточной цитометрии в совокупности с оценкой продуктивности можно использовать в селекции риса для выявления тетраплоидных регенерантов, а также с целью выбраковки гаплоидов, чтобы исключить этап выращивания бесперспективных форм в условиях ex vitro.

Авторы выражают глубокую признательность специалистам лаборатории селекции риса ФГБНУ Приморский НИИСХ за предоставленный гибридный материал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чайка А.К. Становление и развитие аграрной науки на Дальнем Востоке. В сб.: *Дальневосточная наука — агропромышленному производству региона*. Владивосток, 2008: 37-54.
2. Сахно А.Л., Илюшко М.В. Изучение китайской технологии выращивания риса в Хорольском районе Приморского края. *Мат. Межвузовской науч.-практ. конференции «Молодые ученые — агропромышленному комплексу Дальнего Востока»*. Уссурийск, 2011, вып. 11: 44-52.
3. Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 2005, 89: 1870-1878.
4. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, 8: 377-424 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x).
5. *Каталог сортов риса и овощебахчевых культур кубанской селекции (справочно-методическое издание)*. Краснодар, 2016.
6. Змеева В.Н. *Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно полезных признаков в популяциях соматклонов и андрогенных дигаплоидов риса Oryza sativa L.* Автореф. канд. дис. Вла-

- дивосток, 1995.
7. Илюшко М.В. Создание исходного материала для селекции риса методом культуры пыльников *in vitro* на российском Дальнем Востоке. *Мат. науч.-практ. конф. «Роль аграрной науки в обеспечении продовольственной безопасности дальневосточного региона: (к 40-летию Приморского НИИСХ)»*. Владивосток, 2016: 75-79.
 8. Yamamoto T., Soeda Y., Nishikawa A., Hirohara H. A study of somaclonal variation for rice improvement induced by three kinds of anther-derived cell culture techniques. *Plant Tissue Culture Letters*, 1994, 11: 116-121 (doi: 10.5511/plantbiotechnology1984.11.116).
 9. Кучеренко Л.А., Харченко П.Н., Ковалева Е.Н. *Использование методов биотехнологии в селекции риса*. *Мат. Всес. конф. «Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии»*. Л., 1986: 92-96.
 10. Илюшко М.В. Получение регенерантов риса в культуре пыльников *in vitro* одноступенчатым методом. *Вестник Российской сельскохозяйственной науки*, 2016, 5: 20-22.
 11. Кучеренко Л.А., Харченко П.Н. Использование метода культуры тканей в селекции риса. *Сельское хозяйство за рубежом*, 1975, 11: 20-21.
 12. Ochatt S.J. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry*, 2008, 73A: 581-598 (doi: 10.1002/cyto.a.20562).
 13. Murovec J., Bohanec B. Haploid and double haploids in plant breeding. In: *Plant breeding*. Rijeka, Croatia, 2012, Ch. 5: 87-106.
 14. Xu L., Najeeb U., Tang G.H. Haploid and doubled haploid technology. *Adv. Bot. Res.*, 2007, 45: 181-216 (doi: 10.1016/S0065-2296(07)45007-8).
 15. Li Y., Li H., Chen Z., Ji L.-X., Ye M.-X., Wang J., Wang L., An X.-M. Haploid plants from anther culture of poplar (*Populus × beijingensis*). *Plant Cell Tiss. Org.*, 2013, 114: 39-48 (doi: 10.1007/s11240-013-0303-5).
 16. Sood S., Dwivedi S., Reddy T.V., Prasanna P.S., Sharma N. Improving androgenesis-mediated doubled haploid production efficiency of FCV tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) through *in vitro* colchicines application. *Plant Breeding*, 2013, 132: 764-771 (doi: 10.1111/pbr.12114).
 17. Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.*, 2011, 30: 839-857 (doi: 10.1007/s00299-011-1061-7).
 18. Гончарова Ю.К. *Использование метода культуры пыльников в селекции риса*. Краснодар, 2012.
 19. Горбунова В.Ю. *Андрогенез in vitro у яровой мягкой пшеницы*. Автореф. канд. дис. СПб, 2000.
 20. Barow M., Jovtchev G. Endopolyploidy in plants and its analysis by flow cytometry. In: *Flow cytometry with plant cell* /J. Dolezel, J. Greilhuber, J. Suda (eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007: 349-372 (doi: 10.1002/9783527610921.ch15).
 21. Chu C. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proc. Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking, 1978: 43-50.
 22. Pfosser M., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 1995, 21(4): 387-393 (doi: 10.1002/cyto.990210412).
 23. Скапцов М.В., Смирнов С.В., Куцев М.Г., Шмаков А.И. Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений. *Turczaninowia*, 2016, 19(3): 120-122.
 24. Скапцов М.В., Смирнов С.В., Куцев М.Г. Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии. *Turczaninowia*, 2014, 17: 72-78 (doi: 10.14258/turczaninowia.17.3.8).
 25. Skaptsov M.V., Lomonosova M.N., Kutsev M.G., Smirnov S.V., Shmakov A.I. The phenomenon of endopolyploidy in some species of the *Chenopodioideae* (*Amaranthaceae*). *Botany Letters*, 2017, 164(1): 47-53 (doi: 10.1080/23818107.2016.1276475).
 26. Barow M. Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, 2006, 28: 271-281 (doi: 10.1002/bies.20371).
 27. Bai C.K., Alverson W.S., Follansbee A., Waller M.D. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*, 2012, 110: 1623-1629 (doi: 10.1093/aob/mcs222).
 28. Bennett M.D., Smit J.B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1991, 334: 309-345 (doi: 10.1098/rstb.1991.0120).
 29. Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Эпигеномная и эпипластомная изменчивость у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50: 579-589 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.579rus).
 30. Гончарова Ю.К. Селективная элиминация аллелей при получении дигаплоидных линий в культуре пыльников риса. *Генетика*, 2013, 49: 196-203 (doi: 10.7868/S0016675812100025).
 31. Luan L., Wang X., Long W.B., Liu Y.H., Tu S.B., Xiao X.Y., Kong F.L. A comparative cytogenetic study of the rice (*Oryza sativa* L.) autotetraploid restorers and hybrids. *Генетика*, 2009, 45: 1225-1233.
 32. Barker R.E., Kilgore J.A., Cook R.L., Garay A.E., Warnke S.E. Use of flow cytometry to determine ploidy level of ryegrass. *Seed Sci. Technol.*, 2001, 29: 493-502.

33. Smarda P., Bures P., Horova L., Foggi B., Rossi G. Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany*, 2008, 101: 421-433 (doi: 10.1093/aob/mcm307).
34. Bennett M.D., Smith J.B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. T. Roy. Soc. B*, 1976, 274: 227-274 (doi: 10.1098/rstb.1976.0044).

¹ФГБНУ Приморский НИИ сельского хозяйства,
692539 Россия, Приморский край, п. Тимирязевский,
ул. Воложенина, 30,
е-mail: ilyushkoiris@mail.ru;

²Южно-Сибирский ботанический сад

ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет,
656049 Россия, г. Барнаул, просп. Ленина, 61,
е-mail: mr.skaptsov@mail.ru

Поступила в редакцию
30 января 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 3, pp. 531-538

NUCLEAR DNA CONTENT IN RICE (*Oryza sativa* L.) REGENERANTS DERIVED FROM ANTHHER CULTURE in vitro

M.V. Ilyushko¹, M.V. Skaptsov², M.V. Romashova¹

¹Primorskii Research Institute of Agriculture, Federal Agency for Scientific Organizations, 30, ul. Volozhenina, pos. Timiryazevskii, Primorskii Krai, 692539 Russia, e-mail ilyushkoiris@mail.ru (corresponding author);

²South Siberian Botanical Garden of Altai State University, 61, prosp. Lenina, Barnaul, 656049 Russia, e-mail mr.skaptsov@mail.ru

ORCID:

Ilyushko M.V. orcid.org/0000-0001-7042-8641

Skaptsov M.V. orcid.org/0000-0002-4884-0768

Romashova M.V. orcid.org/0000-0002-7426-8523

The author declares no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors would like to deeply thank colleagues from the Laboratory of Rice Breeding (Primorskii Research Institute of Agriculture) for the hybrid rice material provided.

Supported in part by Far East Program for Basic Research of the Far Eastern Branch RAS (grant № 15-I-6-005)

Received January 30, 2017

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.3.531eng

Abstract

Rice is an important food crop grown in the south of the Russian Far East. Therefore, breeding new varieties with high harvest and crop quality is relevant. Anther in vitro culture is successfully applied in breeding programs in rice-growing countries, including Russia. In anther in vitro culture, flow cytometry is applicable to select haploid, dihaploid and polyploid regenerants. Cytological studies show genome variations from haploids to hexaploids in plant tissue in vitro culture, and also chromosome changes which result in aneuploidy or endopolyploidy leading to an inconstant nuclear DNA content. In the work, we followed the aims i) to evaluate nuclear DNA content by flow cytometry in an androgenic rice regenerant population, and ii) to estimate the applicability of the combination of two approaches, the anther in vitro culture technique and flow cytometry, in rice breeding. A total of 1099 regenerants from in vitro anther culture of a single F₂ (UkrNIIS 3435 × Ukr 96) rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Kato) hybrid plant were separated into four groups with regard to morphological features. Haploids were sterile plants with very small flowers, dihaploids were fertile plants, tetraploids were the plants with very few large seeds, an expressed keel and the ribbed floral scales. Also, there were the plants without seeds which flowers were normal in size but formed two or more sterile panicles. In the last group of the regenerants the plants died during early development. A total of 176 regenerants were estimated by flow cytometry. It was revealed that nuclear DNA content varied greatly ($C_v = 32\%$) in the plants without seeds. This group seems to include plants with double set of chromosomes, triploids, tetraploids, and pentaploids. Additionally, in this group we found the regenerants with endopolyploidy since five of the plants had two nuclear DNA content peaks like those for haploids and diploids. In 23 plants nuclear DNA content approximated to dihaploid chromosome set and averaged 2.00 pg. Obviously, an aneuploidy characteristic of rice anther in vitro cultures could lead to aliquant changes in chromosome set in the regenerants, causing a loss of fertility. The dihaploid and tetraploid plants were low variable (C_v of 10.5 and 5.3 %) and had nuclear DNA content of 1.88 and 3.75 pg, respectively, whereas the haploids were high variable ($C_v = 29\%$) with an average nuclear DNA amount of 0.89 pg. Our findings indicate that flow cytometry, together with production index, may be applied to reveal tetraploid regenerants and to remove haploids in rice breeding. That allows avoiding ex vitro trials of unpromising regenerants.

Keywords: *Oryza sativa* L., anther culture in vitro, flow cytometry, regenerant, haploid, dihaploid, tetraploid.