

БЛИНСЬКА О. В.[✉], ШЕЛЯКІНА Т. А.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України,

Україна, 61060, м. Харків, проспект Героїв Харкова, 142, ORCID: 0000-0003-1963-3679, 0000-0003-2255-8550

[✉] bilynskaov@gmail.com

ЗДАТНІСТЬ ДО АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* СОРТІВ І ЛІНІЙ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ (*HORDEUM VULGARE* L.) – ДЖЕРЕЛ ОЗНАКИ ВИСОКИЙ ВМІСТ БІЛКА В ЗЕРНІ

Мета. Визначити здатність до утворення гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* зразків ярого ячменю, які є джерелами ознаки високий вміст білка в зерні. **Методи.** Інфрачервона спектроскопія для оцінювання мінливості за вмістом білка. Культивування пиляків, вилучених із попередньо обробленого за низької позитивної температури колосся, на живильних середовищах, які містили солі макро- та мікроелементів відповідно за прописами N6 та MS, фізіологічно активні речовини, мальтозу (9,0 %) та агар. **Результати.** У шести зразків вміст білка варіював у середньому за три роки досліджень від 12,6 % до 19,1 %. Виділено сорт Явір і колекційні зразки IR06605 та DD-21, які характеризувалися стабільністю прояву зазначеної ознаки. Здатність до андрогенезу *in vitro* коливалася в залежності від генотипу та умов вирощування дононих рослин від 6,9 % до 45,9 % за кількістю морфогенних пиляків та від 0,6 до 14,7 зелених рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків. **Висновки.** Найбільш цінними для використання в селекції на високобілковість є сорти ярого ячменю Великан та Явір, які поєднують високий рівень прояву цільової ознаки з середньою здатністю до продукування гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro*.

Ключові слова: *Hordeum vulgare* L., вміст білка, культура пиляків *in vitro*, морфогенні пиляки, регенерація рослин.

Важливою передумовою масового одержання подвоєних гаплоїдів у рамках певних селекційних програм є наявність відомостей щодо здатності до андрогенезу *in vitro* у залученого до гаплоїдизації рослинного матеріалу. Оскільки ця ознака є генетично детермінованою і спадковою [1–3], виділення генотипів з високим рівнем морфогенетичної реакції та подальше їх використання для одержання гібридів і ДН-

ліній дозволяє не лише суттєво підвищити ефективність гаплопродукційного процесу, й прогнозувати результати і визначати обсяги робіт. Найбільшу цінність для гаплоїдної селекції мають генотипи, що поєднують цільову ознаку або комплекс цінних ознак зі здатністю до утворення андрогенних гаплоїдів.

Варто зазначити, що скринінг як джерел цінних господарських ознак, так і елітної зародкової плазми ячменю та інших сільськогосподарських культур щодо здатності до андрогенезу *in vitro* був і залишається важливим напрямом досліджень у галузі експериментальної гаплоїдії [4–8]. Завдяки цим дослідженням, зокрема, виділено модельні генотипи для вивчення генетичних основ експериментального андрогенезу *in vitro* та експериментів з удосконалення технологій гаплоїдної індукції [9, 10].

Характеристика національних та світового генофондів ячменю щодо здатності до продукування гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* є важливою не лише для розширення уявлень про мінливість за цією унікальною ознакою, але й для більш ефективного впровадження сучасних біотехнологічних методів для створення вихідного селекційного матеріалу. За результатами багаторічних досліджень нами створено ознакову колекцію ярого ячменю за здатністю до андрогенезу *in vitro*, до складу якої входять генотипи, що поєднують високий або середній рівень прояву цієї ознаки з такими цінними морфо-біологічними характеристиками, як безосіть, голозерність, стійкість до хвороб [11]. Колекція постійно поповнюється за рахунок щорічного тестування щодо андрогенної здатності нових надходжень до Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Метою цього дослідження було оцінювання за здатністю до андрогенезу *in vitro* зраз-

ків ярого ячменю, які є джерелами ознаки високий вміст білка у зерні.

Матеріали і методи

Досліджена вибірка включала шість зразків ярого ячменю (IR06605, DD-21, Condor, Великан, Убаган, Явір), які зареєстровані у Національному центрі генетичних ресурсів рослин України як джерела ознаки високий вміст білка в зерні. Зразок IR06605 є еталоном високого вмісту білка в зерні. Як еталони здатності до андрогенезу *in vitro* використано лінію андрогенного походження ДГ00-126 та сорт Mebere, які мають відповідно високий та низький рівень прояву ознак культурабельності за результатами багаторічних досліджень.

Вміст білка в зерні було визначено методом інфрачервоної спектроскопії, який ґрунтується на поглинанні хімічними компонентами проби, зокрема молекулами білка, електромагнітного випромінювання у ближньому інфрачервоному діапазоні. Вимірювання проводили за використання інфрачервоного аналізатора «Інфралом ФТ-10» («Люмекс», РФ) згідно інструкції.

Для визначення вмісту білка використано зерно урожаю 2019, 2021 та 2022 рр., який одержано на дослідній ділянці (попередник – чорний пар або ячмінь). У 2019 р. по пару було внесено гній та комплексне мінеральне добриво. У 2021 р. сівбу було проведено по чорному пару з внесенням лише мінерального добрива. У 2022 р. сіяли по попереднику ячмінь з внесенням мінерального добрива. На цій же ділянці вирощували рослини для одержання асептичної культури пиляків. Біотехнологічні дослідження було проведено у 2021 та 2022 рр. У 2021 р. сівбу було проведено у третій декаді березня. Гідротермічний режим третьої декади березня другої і третьої декад квітня сприяв отриманню дружніх сходів і куццю. Впродовж фази вихід у трубку спостерігалася прохолодна погода з опадами, що сприяло одержанню високоякісного рослинного матеріалу. Погодні умови, які склалися у 2022 р., були менш сприятливими для вирощування матеріалу для біотехнологічних досліджень. Через пізню весну сівбу було проведено у другій декаді квітня. Підвищення температури на тлі недостатньої кількості опадів впродовж фаз куццю та виходу у трубку призвело до погіршення стану посівів.

Колосся добирали у момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку,

які визначали на тимчасових препаратах пиляків. Попередню обробку колосся проводили за температури 4° С: у 2021 р. впродовж 28 діб згідно розробленого способу [12], а у 2022 р. – шляхом витримування пагонів у воді впродовж 5–6 діб. Стерилізацію рослинного матеріалу здійснювали, обробляючи колосся у листовій піхві 70 %-им етиловим спиртом впродовж 20 хв.

Для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMSмод. 2 [13], яке містило солі макроелементів середовища N6 [14], мікроелементів середовища MS [15] і такі компоненти як: 2,4-Д – 2 мг/л (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота); БАП (6-бензиламінопурин); вітаміни В₁ – 1 мг/л; В₆ і РР – по 0,5 мг/л; гліцин – 2 мг/л; аланін, глутамінова кислота і пролін – по 100 мг/л; лактальбумін – 300 мг/л; міо-інозитол – 100 мг/л; а також мальтозу – 90 г/л; агар – 0,8 % (Ferak, США).

Склад базового регенераційного середовища: мінеральна основа МС [15] зі зниженим до 3 % вмістом сахарози, 100 мг/л міо-інозитулу, 100 мг/л глутаміну, 0,5 мг/л БАП та 0,05 мг/л НОК, агар (0,8 %).

Ефективність андрогенезу *in vitro* визначено за кількістю морфогенних пиляків у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків та кількістю рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків. Результати досліджень оброблено за допомогою дисперсійного аналізу за використання програми «Microsoft Office Excel 2010».

Результати та обговорення

За результатами аналізу зерна урожаю 2019 р. підтверджено статус джерел високого вмісту білка за сівби по пару з внесенням гною та комплексного мінерального добрива для усіх зразків. Зокрема, розмах варіювання за вмістом білка становив від 16,2 % у сорту Явір до 22,4 % у колекційного зразка DD-21. У еталонного зразка IR06605 вміст білка сягав 18,9 %. У 2021 р. за сівби по пару з внесенням комплексного мінерального добрива без гною вміст білка коливався від 10,7 % до 17,4 %. Лише у двох голозерних зразків IP 06605 та DD-21 цей показник перевищив 17 %, а у решти був на рівні 10,5–11,3 %. У 2022 р. за сівби по попереднику ячмінь з внесенням комплексного мінерального добрива вміст білка був у межах від 12,2 до 18,5 %. За цим показником виділилися еталон високого

вмісту білка IR06605 (18,5 %), зразок DD-21 (17,2 %), сорти Великан (14,9 %) та Явір (16,10 %).

Аналіз експериментальних даних з андрогенезу *in vitro* (табл. 1) показав, що у 2021 р. морфогенні структури і рослини-регенеранти було одержано в усіх генотипів. Генотипи-еталони – DN00-126 та Mebere – зберегли свої ранги щодо андрогенної здатності. Розмах мінливості за інтенсивністю індукції морфогенних структур був досить великим: від 6,86 % морфогенних пиляків у зразка IR06605 до 45,97 % у сорту Великан. Відносно високий рівень прояву цієї ознаки відмічено також у сорту Явір – 31,20 % (табл. 1, рис.).

Ці ж генотипи були кращими за виходом зелених рослин-регенерантів. Зокрема, у сорту Великан було одержано біля 15 нормально піг-

ментованих рослин на 100 пиляків. У сорту Явір – 6,4 нормально пігментованих рослин на 100 пиляків. Натомість у решти генотипів цей показник був нижче 3 % (табл. 1).

За пізнього строку сівби та менш сприятливих умов вирощування донорних рослин у 2022 р. було одержано рослинний матеріал досить низької якості. Зокрема, рослини у момент добору матеріалу для одержання асептичної культури пиляків були низькорослими, з дрібним колоссям і пиляками. З огляду на це для запобігання втрати колоссям і пиляками тургору була застосована короткотривала (п'ять діб) попередня обробка пагонів у воді замість довготривалого зберігання ізольованого колосся без контакту з водою у чашках Петрі [12]. .

Таблиця 1. Здатність до андрогенезу *in vitro* сортів і ліній ярого ячменю – джерел ознаки високий вміст білка в зерні, 2021 р.

Назва зразка	Висаджено пиляків, шт.	Одержано			
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
		шт.	%	шт.	шт. на 100 пиляків
DN00-126	314	185	58,92	154	49,04
Mebere	191	35	18,32	4	2,09
Condor	259	41	15,83	6	2,32
Великан	509	234	45,97	75	14,73
Убаган	378	35	9,25	6	1,59
IR06605	379	26	6,86	6	1,58
DD-21	314	32	10,19	2	0,64
Явір	359	112	31,20	23	6,40
НІР ₀₅	–	–	6,00	–	3,98

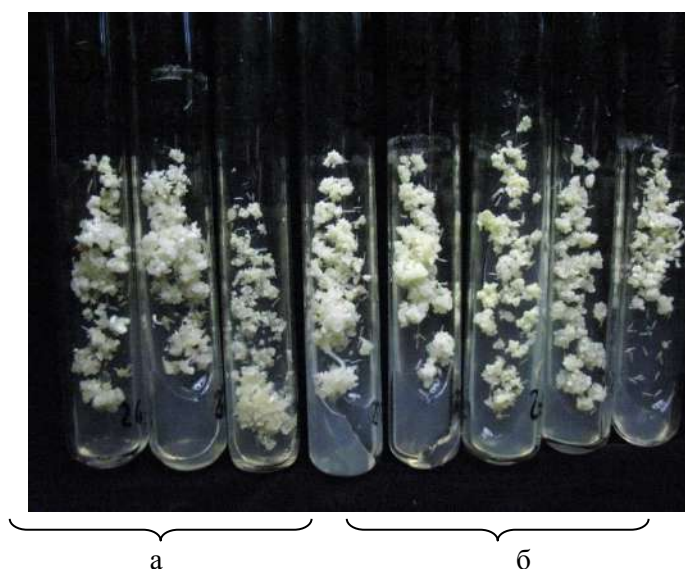


Рис. Індукція морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* сортів ярого ячменю Великан (а) та Явір (б).

Таблиця 2. Здатність до андрогенезу *in vitro* сортів і ліній ярого ячменю – джерел ознаки високий вміст білка в зерні, 2022 р.

Генотип	Висаджено пиляків, шт.	Одержано			
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
		шт.	%	шт.	шт. на 100 пиляків
DH00-126	421	184	43,71	98	23,04
Meberge	393	54	13,74	4	1,02
Великан	417	142	34,05	26	6,23
Condor	380	44	11,57	4	1,05
Убаган	342	16	4,68	3	0,88
IR06605	378	21	5,55	2	0,53
DD-21	373	28	7,51	0	0,00
Явір	377	87	23,08	11	2,91
НІР ₀₅	–	–	5,09	–	2,83

Варто зазначити, що як несприятливі погодні умови, так і застосування базового режиму попередньої обробки рослинного матеріалу замість удосконаленого прогнозовано призвели до зниження ефективності гаплопродукційного процесу. Про це насамперед свідчить зменшення кількості морфогенних пиляків та зелених рослин-регенерантів у еталонних генотипів. Зокрема, у лінії DH00-126 вихід зелених регенерантів зменшився майже вдвічі – з 49,0 до 23,0 шт. на 100 культивованих пиляків (табл. 2)

Істотно нижчими були показники андрогенної здатності і у джерел високого вмісту білка в зерні. Проте, як і у попередньому експерименті, серед останніх за кількістю морфогенних пиляків виділилися сорти Великан (34,05 %) та Явір (23,08 %). Сорт Великан мав також істотно вищий порівняно з іншими високобілковими генотипами вихід зелених рослин-регенерантів – 6,2 рослин на 100 культивованих пиляків. Усі інші зразки, включно з еталоном високого вмісту білка IR06605 та зразком DD-21, можна віднести до генотипів з низькою здатністю до утворення морфогенних структур та зелених рослин-регенерантів.

За участі джерел високого вмісту білка в зерні нами одержано гібриди F₁ 20 комбінацій схрещування, включно з 13 комбінаціями з *H. spontaneum* C. Koch. Thell. Виходячи із характеру успадкування здатності до андрогенезу *in vitro* у ячменю [1, 10], можна з високою вірогідністю прогнозувати успішну гаплоїдизацію саме у гібридних комбінаціях, де як батьківський чи материнський компонент використано сорти Великан та Явір. Інші джерела високобілковості

з дослідженої вибірки варто залучати до гібридизації з сортами та лініями з високою здатністю до андрогенезу *in vitro* для підвищення ефективності одержання гаплоїдів. Разом з тим, слід враховувати і можливість гетерозису за здатністю до андрогенезу *in vitro* в окремих комбінаціях та значну роль епістазу у генетичному контролі цієї ознаки [10], а також брати до уваги і різну направленість домінування [1].

Лінії подвоєних гаплоїдів, які можуть бути одержані на основі гібридів за участі джерел високого вмісту білка, є придатними не лише для використання у селекції, а й у генетичних дослідженнях з вивчення генетичного контролю цієї цінної господарської ознаки, включно з розробкою ефективних систем молекулярно-генетичних маркерів. Швидкість створення таких ліній та рекомбінантна структура їх геному на тлі цілковитої гомозиготності дозволяють подолати більшість методичних обмежень генетичного аналізу ознак якості та підвищити його інформативність.

Висновки

Вперше одержано характеристику здатності до андрогенезу *in vitro* сортів і колекційних зразків НЦГРРУ, які є генетичними джерелами високого вмісту білка в зерні. Підтверджено стабільний рівень прояву цієї ознаки у зразків IR06605, DD-2 та у сорту Явір. Найбільшу цінність для використання у селекції на високий вміст білка становлять сорти Великан та Явір, які поєднують високий рівень прояву цільової ознаки з середньою здатністю до продукування андрогенних гаплоїдів.

References

1. Powell W. Diallel analysis of anther culture response. *Genome*. 1989. Vol. 30. P. 101–109.
2. Hale B., Ferrie A. M. R., Chellamma S., Samuel J. P., Phillips G. C. Androgenesis-based dou-bled haploidy: past, present, and future perspectives. *Front. Plant. Sci.* 2022. Vol. 12. doi: 10.3389/fpls.2021.751230.
3. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. Haploids: con-straints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33 (6). P. 812–829. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
4. Asakavičiute R., Pašakinskiene I. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley cultivars. *Biologie*. 2006. No. 4. P. 37–40.
5. Makowska K., Oleszczuk S., Zimny A., Czaplicki A., Zimny J. Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley. *Plant Breed.* 2015. Vol. 134. P. 668–674. doi: 10.1111/pbr.12312.
6. Naik N., Rout P., Umakanta N., Verma R. L., Katara J. L., Sahoo K. K., Singh O. N., Saman-taray S. Development of doubled haploids from an elite *indica* rice hybrid (BS6444G) using anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017. Vol. 128 (3). P. 679–689. doi: 10.1007/s11240-016-1149-4.
7. Lantos C., Bóna L., Nagy É., Békés F., Pauk J. Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. *Plant Cell Tis-sue Organ Cult.* 2018. Vol. 133 (3). P. 385–393. doi: 10.1007/s11240-018-1391-z.
8. Gajeka M., Marzec M., Chmielewska B., Jelonek J., Zbieszczak J., Szarejko I. Plastid differ-entiation during microgameto-genesis determines green plant regeneration in barley microspore culture. *Plant Science*. 2020. Vol. 291. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110321.
9. Powell W. The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1988. Vol. 12. P. 291–297.
10. Belinskaya E. V. Inheritance of potential for *in vitro* androgenesis in spring barley. *Cytology and Genetics*. 2008. Vol. 42 (4). P. 27–37. doi: 10.3103/S009545270804004X.
11. Belinskaya E. V. Formation of barley trait collection by response to androgenesis *in vitro* and its use in genetic and biotechno-logical investigations. *Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2007. Vol. 5 (1, 2). P. 11–20. [in Russian]
12. Bilynska O. V. Influence of spike pretreatment at a low temperature on the efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020. 30 (1). P. 68–76. doi: 10.15407/cryo30.01.068.
13. Bilynska O. V. Effect of nutrient media containing natural and chemically modified starches on haploid production in spring barley anther culture *in vitro*. In: *Biological Systems, Biodiversity, and Stability of Plant*. Waretown (USA) : Apple Academic Press, 2015. P. 211–228.
14. Chu C. C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Plant Tissue Culture: Proc. Symp.* Peking : Science Press, 1978. P. 43–45.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cul-tures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

BILYNSKA O. V., SHELYAKINA T. A.

Plant Production Institute n. a. V. Ya. Yuriev of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Heroiv Kharkova ave., 142

ANDROGENIC RESPONSE OF SPRING BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) VARIETIES AND LINES – SOURCES OF HIGH GRAIN PROTEIN CONTENT

Aim. Protein content is known to be one of the most important characters of grain quality. Investiga-tion was aimed to determine the capability to haploid production in anther culture *in vitro* of spring barley accessions which are the sources of high protein content in grain. **Methods.** Infrared spectros-copy was used for evaluation of variability of barley genotypes in protein content. Anthers isolated from cold-pretreated spikes were cultivated on agar solidified nutrient medium containing N6 macro-and MS micronutrients, physiologically active substances and maltose (9.0 %). **Results.** Three years testing showed that mean grain protein contents in six spring barley accessions varied from 12.6 to 19.1 %. Commercial variety Yavir, accessions IR06605 and DD-21 from germplasm collection of the National Plant Gene Pool of Ukraine were selected as genotypes with a stable expression of this char-acter. Response to androgenesis *in vitro* varied from 6.9 to 45.9 % of morphogenic anthers and from 0.64 до 14.7 green plants per 100 cultivated anthers in dependence of genotype and donor plant growth conditions. **Conclusions.** Because of association between high protein content in grains and a relatively high androgenic response, varieties Velikan and Yavir were considered to be the most valu-able ones for use in spring barley breeding for improvement of protein content via anther culture *in vitro*.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., protein content, anther culture *in vitro*, morphogenic anthers, plant regeneration.