

БІЛИНСЬКА О. В.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України,
Україна, 61060, м. Харків, проспект Героїв Харкова, 142, ORCID: 0000-0003-1963-3679,
e-mail: bilynskaov@gmail.com, (068) 566-03-20

ОЦІНЮВАННЯ ВПЛИВУ СУЛЬФАТУ МІДІ НА ІНДУКЦІЮ МОРФОГЕННИХ СТРУКТУР І РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ЯРОГО ЯЧМЕНЮ

Мета. З'ясувати можливість підвищення ефективності гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю за рахунок збільшення концентрації іонів міді в розчині для попередньої обробки пагонів і середовищах для індукції морфогенних структур і регенерації рослин. **Методи.** 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. У дослідних варіантах концентрацію сульфату міді було збільшено до 5 та 10 μM . **Результати.** Додавання сульфату міді до розчину для попередньої обробки не впливало ні на збереженість пагонів, ні на перебіг морфогенезу у культурі пиляків *in vitro*. Найгіршим щодо частоти регенерації зелених рослин був варіант досліду, у якому концентрацію іонів міді було збільшено як у індукційному, так і у регенераційному середовищах. **Висновки.** Додавання сульфату міді до розчину для попередньої обробки пагонів, як і збільшення концентрації цього мікроелемента у живильних середовищах до 10 μM , не можна вважати методичним прийомом, придатним для підвищення ефективності одержання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю.

Ключові слова: *Hordeum vulgare* L., культура пиляків *in vitro*, живильне середовище, сульфат міді, морфогенні пиляки, регенерація рослин.

Культура пиляків разом із більш сучасною методичною версією експериментального андрогенезу *in vitro* – культурою ізольованих мікроспор – залишаються найбільш ефективними методами одержання гаплоїдів і константних гомозиготних ліній у переважній більшості видів рослин, що використовуються у сільськогосподарському виробництві [1]. Особливо великих успіхів досягнуто у ячменю, для якого роз-

роблено кілька протоколів з детальним описом усіх етапів технології гаплоїдної індукції [2]. Але незважаючи на доведену результативність цих розробок, актуальними залишаються питання збільшення виходу рослин-регенерантів до справді масових обсягів і подолання генотипної залежності морфогенезу, індукованого шляхом зміни програми розвитку мікроспор *in vitro* [3].

Варто зазначити, що для підвищення ефективності одержання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* ячменю та інших видів рослин запропоновано багато методичних підходів. Зокрема, значна увага приділяється удосконаленню попередньої обробки колосся або пиляків та оптимізації складу живильних середовищ для культивування пиляків і регенерації рослин [2]. У складі живильних середовищ об'єктом оптимізації є практично усі компоненти, включно з мінеральною основою, тобто композицією солей макро- та мікроелементів. Так, було рекомендовано зменшити у десять разів вміст амонійного азоту порівняно з базовим середовищем MS [4] в індукційному живильному середовищі FHG для культивування пиляків та ізольованих мікроспор ячменю [5]. Одне з найбільш ефективних середовищ для культивування пиляків (N6) практично не містить мікроелементів за істотного збільшення порівняно з середовищем MS рівня нітратного азоту і зменшення вмісту азоту амонійного [6].

Щодо ролі окремих елементів у стимулюванні регенерації рослин, то на увагу заслуговують насамперед повідомлення про значне (від 10 до 100 разів) збільшення вмісту іонів міді у середовищах для культивування як соматичних, так генеративних клітин. І якщо у роботах, опублікованих у 90-ті роки превалює емпіричний підхід з констатацією досягнутого ефекту (збільшення частоти регенерації, життєздатності регенерантів тощо) [7], то у публікаціях останніх років підвищення вмісту іонів міді обґрунтовують роллю цього мікроелемента у багатьох біохімічних і фізіологічних процесах [8], а та-

© БІЛИНСЬКА О. В.

кож у процесах, пов'язаних з епігенетичним контролем морфогенезу *in vivo* та *in vitro* [9].

За даними L. Purnhauser [7] додавання до середовища для регенерації 10 μM CuSO_4 замість 0,1 μM (рівень у базовому середовищі MS) привело до п'ятиразового зростання кількості морфогенних калюсів і восьмиразового збільшення кількості пагонів у культурі соматичних клітин пшениці. Збільшення концентрації сульфату міді до 5 μM і до 50 μM сприяло істотному зростанню частоти регенерації рослин у калюсній культурі, одержаній за культивування *in vitro* незрілих зародків ячменю [10]. Позитивний ефект щодо збільшення частоти регенерації нормально пігментованих рослин було досягнуто за додавання іонів міді до середовища для культивування пиляків ячменю [11].

Застосування для дослідження механізмів перепрограмування розвитку мікоспор і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* методів молекулярної генетики дозволило отримати переконливі докази впливу деметилювання і метилювання ДНК на ці процеси [9]. Також було виявлено зв'язок між зазначеними модифікаціями у структурі ДНК і наявністю у живильному середовищі іонів міді та срібла. Більш того, було встановлено вплив цих мікроелементів на ступінь метилювання і деметилювання ДНК у регенерантів ячменю андрогенного походження в залежності від тривалості перебування пиляків на індукційному середовищі [12]. Ефективним було і додавання 10 μM сульфату міді до 0,3 М розчину манітолу, який застосовувався для попередньої обробки колосся [13].

Тож, зважаючи на позитивні результати експериментів щодо впливу міді на регенерацію у різних експериментальних системах, мета роботи полягала у з'ясуванні доцільності застосування підвищених концентрацій цього мікроелемента для стимулювання андрогенезу *in vitro* у ярого ячменю.

Матеріали і методи

Як модельні генотипи було використано лінію ярого ячменю андрогенного походження ДГ00-126 і сорт Mebere, які характеризуються контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*.

Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах. Досліди проведено у 2019 та 2022 рр. У 2019 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 помірно тепла погода з опадами, що сприяло отриманню рослинного матеріалу відмінної якості. У 2022 р. через пізню весну сівбу вдалося провести лише у другій декаді квітня. Недостатня кількість опадів та висока температура у фазу вихід у трубку призвели до пригнічення ростових процесів, зокрема до зменшення розміру колосся і пиляків, що істотно знизило якість останніх як експлантів для біотехнологічних досліджень.

Колосся добирали у момент досягнення мікоспорами середньої та пізньої фаз розвитку. Попередню обробку колосся проводили шляхом витримування пагонів у воді при температурі 4°C у холодильнику впродовж 5–6 діб (контроль) і за тих же умов у розчинах, які містили 5 та 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (дослідні варіанти). Стерилізацію рослинного матеріалу здійснювали, обробляючи колосся у листовій піхві 70 %-им етиловим спиртом впродовж 20 хв.

Для підтвердження літературних даних щодо стабілізації іонами міді фотосинтетичного апарату [14], що може мати значення для подолання проблеми альбінізму регенерантів андрогенного походження, а також для визначення фітотоксичної дії іонів міді зрізані пагони сорту Mebere було вміщено у розчин сульфату міді (концентрація 10 μM) та у проточну воду і витримано на світлі впродовж 10 діб за температури 22–24°C.

Як базове і контроль для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMS мод. 2 [15], яке містило як гелеутворювач агар (0,8 %, Ferak, США).

Схема досліду з оцінювання можливості підвищення частоти індукції морфогенних структур і регенерації рослин шляхом додавання до складу живильних середовищ 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ включала контроль і три дослідні варіанти. Зокрема, було передбачено культивування пиляків лінії DH00-126 і сорту Mebere на базовому індукційному середовищі з подальшою пересадкою морфогенних структур на базове регенераційне середовище (контроль) і середовище, до складу якого було додано $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у зазначеній вище концентрації (перший варіант). У другому дослідному варіанті пиляки культивували на індукційному живильному середовищі з 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, а одержані морфогенні структури переносили на базове регенераційне середовище. У третьому варіанті 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ було додано як до

індукційного, так і до регенераційного середовища. Склад базового регенераційного середовища: мінеральна основа MS [4] зі зниженим до 3 % вмістом сахарози, 100 мг/л міо-інозиту, 100 мг/л глютаміну, 0,5 мг/л БАП та 0,05 мг/л НУК, агар (0,8 %).

Ефективність андрогенезу *in vitro* у дослідках було оцінено за кількістю морфогенних пиляків у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків і кількістю рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків. Результати досліджень оброблено за допомогою методів варіаційної статистики за використання пакету програм Microsoft Office (Excel 2010).

Результати та обговорення

Спостереження за станом пагонів, які було витримано у розчині з 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ за температури 22–24°C впродовж 10 діб на денному світлі, засвідчило відсутність різниці між дослідним і контрольним варіантами щодо збереженості матеріалу, що принаймні за умов дослідження не підтверджує стабілізуючого ефекту міді на фотосинтетичний апарат рослин, зокрема на динаміку втрати листками зеленого забарвлення [8].

Порівняння ефективності індукції морфогенних структур і регенерації рослин за попередньої обробки пагонів у розчинах сульфату міді показало, що у лінії DH00-126 кількість морфогенних пиляків у контролі (вода) та за концентрацій 5 μM та 10 μM становила відповідно 48,2, 50,3 та 51,7 % за відсутності істотних відмінностей між варіантами дослідження. Істотної різниці не було виявлено і за виходом зелених рослин-регенерантів – відповідні показники були на рівні 36,1 шт. (5 μM Cu^{2+}), 37,7 шт. (контроль) та 38,4 шт. (10 μM Cu^{2+}) рослин на 100 культивованих пиляків. У нечутливого до андрогенезу *in vitro* сорту Mebere у контролі було одержано 25,9 % морфогенних пиляків, а у дослідних варіантах – 23,0 % (5 μM Cu^{2+}) та 26,6 % (10 μM Cu^{2+}). Регенерація зелених рослин коливалася від 0,76 до 1,57 шт. на 100 культивованих пиляків за відсутності істотної різниці між контролем і дослідними варіантами.

Було проведено (дослід 2022 р.) визначення динаміки утворення морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* двох згаданих вище генотипів на середовищах, що різнилися вмістом іонів міді. Як видно з таблиці 1, збільшення вмісту сульфату міді до 10 μM істотно не впливало на індукційні процеси у межах певно-

го часового інтервалу. Натомість природно зростала кількість морфогенних пиляків із збільшенням тривалості культивування пиляків на індукційному середовищі.

Для визначення впливу збільшення концентрації іонів міді не лише на індукцію морфогенних структур, але й на регенерацію рослин, морфогенні структури, індуковані на середовищі з високим вмістом іонів міді, пересаджували на регенераційне середовище з базовим мінеральним складом і, навпаки, структури, утворені на базовому індукційному середовищі, перенесли на регенераційне середовище із збільшеним вмістом іонів міді. Також було досліджено вплив одночасного підвищення вмісту іонів міді в індукційному та регенераційному середовищах.

Дослідження показали, що незалежно від складу обох типів середовищ генотипи зберігали притаманні їм особливості регенераційних процесів (рис. 1, 2, табл. 2).

Зокрема, лінія DH00-126 очікувано перевищила сорт Mebere за кількістю морфогенних пиляків і рослин-регенерантів, зберігаючи притаманну їй властивість до утворення рослин на індукційному середовищі за рахунок проростання ембріодів. У сорту Mebere, який характеризувався низькою андрогенною здатністю, індукційні процеси відбувалися повільніше, а морфогенні структури були представлені переважно калюсом. Позитивного впливу іонів міді на індукційні та регенераційні процеси не виявлено. Більш того, найгіршим, хоча й на рівні тенденції, щодо частоти регенерації зелених рослин у лінії DH00-126 був варіант дослідження, у якому концентрацію іонів міді було збільшено як у індукційному, так і у регенераційному середовищах.

Аналізуючи результати цього дослідження, варто відмітити їх невідповідність літературним даним щодо стимулюючої дії іонів міді на регенерацію як у культурі ізольованих незрілих зародків м'якої пшениці [7] та ячменю [10], так і у культурі пиляків *in vitro* [12]. Причиною того, що у нашому експерименті не вдалося відтворити позитивні результати досліджень з модифікації живильних середовищ за рахунок збільшення вмісту Cu^{2+} , можуть бути відмінності у наборі використаних генотипів і їхня різна чутливість до іонів міді. Зокрема було показано, що однакового морфогенетичного ефекту у культурі ізольованих зародків двох сортів ячменю було досягнуто за концентрацій Cu^{2+} , які відрізня-

лися у десять разів (5 μM та 50 μM) [10]. Тож не виключено, що лінія DH00-126 та сорт Mebere є стійкими до дії іонів міді, і для одержання помітного ефекту у культурі пиляків *in vitro* має бути застосована більш висока концентрація цього мікроелемента. Варто також враховувати і досить низьке (максимально до трьох зелених рослин на 100 пиляків) зростання частоти регенерації у сорту NAD2 в експерименті з визначення

впливу на цей показник рівня метилювання і деметилювання ДНК у присутності іонів міді і срібла [12]. Такий рівень регенерації, попри беззаперечну актуальність вивчення механізмів регуляції морфогенезу на молекулярному рівні, може свідчити про доцільність пошуку більш ефективних шляхів підвищення виходу зелених рослин-регенерантів ячменю у культурі пиляків *in vitro*.

Таблиця 1. Динаміка утворення морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю на середовищах, які різнилися вмістом іонів міді

Тривалість культивування, днів	Індукційне середовище	Висаджено пиляків, шт.	Одержано морфогенних пиляків	
			шт.	%
DH00-126				
25	NMS	824	147	17,84 \pm 1,33
	NMS-Cu ²⁺	747	138	18,47 \pm 1,42
30	NMS	824	251	30,46 \pm 1,60
	NMS-Cu ²⁺	747	256	34,27 \pm 1,74
35	NMS	824	342	41,50 \pm 1,72
	NMS-Cu ²⁺	747	294	39,35 \pm 1,79
Mebere				
25	NMS	843	49	5,81 \pm 0,80
	NMS-Cu ²⁺	843	39	4,63 \pm 0,72
30	NMS	843	108	12,81 \pm 1,15
	NMS-Cu ²⁺	843	110	13,05 \pm 1,16
35	NMS	843	121	14,35 \pm 1,21
	NMS-Cu ²⁺	843	123	14,59 \pm 1,22

Примітки: NMS – базове індукційне живильне середовище (0,1 μM CuSO₄·5H₂O); NMS-Cu²⁺ – 10 μM CuSO₄·5H₂O. У таблиці наведено середнє квадратичне відхилення.

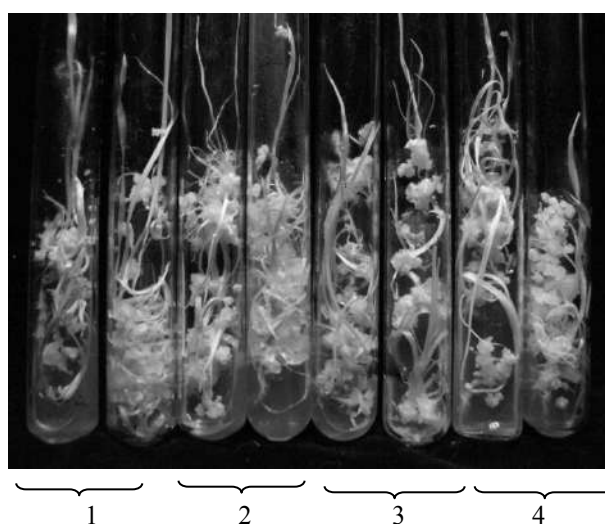


Рис. 1. Регенерація рослин у культурі пиляків лінії ярого ячменю DH00-126 на живильних середовищах, що різнилися додаванням 10 μM CuSO₄·5H₂O: 1) індукційне середовище NMS (базове), регенераційне середовище R (базове); 2) індукційне середовище NMS, регенераційне середовище R-Cu²⁺; 3) індукційне середовище NMS-Cu²⁺, регенераційне середовище R (базове); 4) індукційне середовище NMS-Cu²⁺, регенераційне середовище R-Cu²⁺.

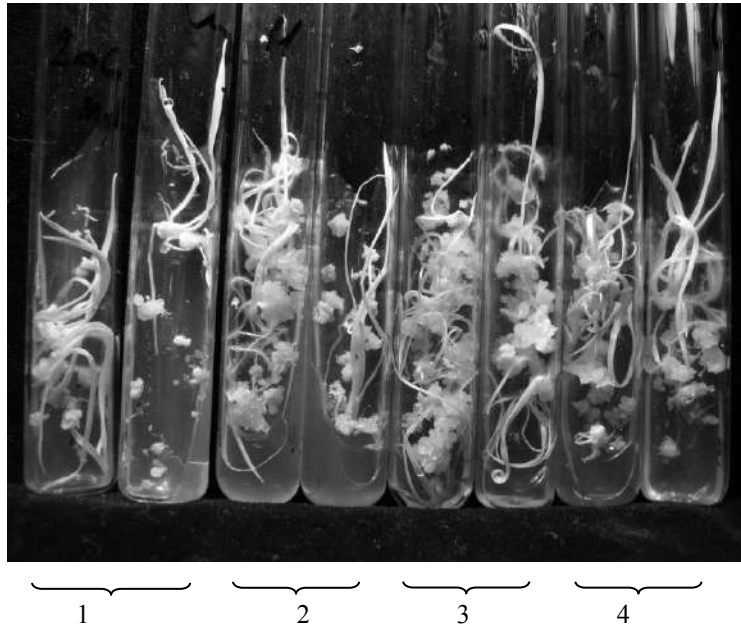


Рис. 2. Регенерація рослин у культурі пиляків сорту ярого ячменю Mebere на живильних середовищах, що різнилися додаванням $10 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Позначення, як на рис. 1.

Таблиця 2. Індукція морфогенних структур і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю в залежності від вмісту у живильних середовищах іонів міді

Живильні середовища для індукції та регенерації		Висаджено пиляків, шт.	Одержано			
			морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
для індукції	для регенерації		шт.	%	шт.	шт. на 100 пиляків
DH00-126						
NMS	R	421	184	$43,71 \pm 2,42$	89	$21,14 \pm 1,99$
NMS	R-Cu ²⁺	399	158	$39,59 \pm 2,44$	69	$17,29 \pm 1,89$
NMS-Cu ²⁺	R	400	158	$39,50 \pm 2,44$	86	$21,50 \pm 2,05$
NMS-Cu ²⁺	R-Cu ²⁺	349	137	$39,25 \pm 2,61$	51	$14,61 \pm 1,89$
Mebere						
NMS	R	441	58	$13,52 \pm 1,62$	4	$0,91 \pm 0,45$
NMS	R-Cu ²⁺	402	62	$15,42 \pm 1,80$	4	$1,00 \pm 0,49$
NMS-Cu ²⁺	R	394	64	$16,24 \pm 1,86$	2	$0,50 \pm 0,35$
NMS-Cu ²⁺	R-Cu ²⁺	360	58	$16,11 \pm 1,94$	3	$0,83 \pm 0,52$

Примітки: NMS – базове індукційне живильне середовище ($0,1 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$); NMS-Cu²⁺ – $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$. R – регенераційне середовище ($0,1 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$); R-Cu²⁺ – $10 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. У таблиці наведено середнє квадратичне відхилення.

Висновки

Попередня обробка пагонів у розчинах, що містили 5 та $10 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, як і модифікація індукційного та регенераційного живильних середовищ шляхом збільшення до $10 \mu\text{M}$ вмісту сульфату міді, не мала стимулюючого впливу на утворення морфогенних структур і

регенерацію рослин у культурі пиляків *in vitro* двох контрастних за андрогенною здатністю генотипів ярого ячменю. Цей методичний прийом не може бути рекомендований для застосування у технологіях масового одержання гаплоїдів.

References

1. Niazian M., Shariatpanahi M. E. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica*. 2020. Vol. 216, No. 5. doi: 10.1007/s10681-02002609-7.
2. Doubled haploid production in crop plants. Ad. M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht : Kluwer academic publishers, 2003. 428 p.
3. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33, No. 6. P. 812–829. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
5. Kasha K. J., Simion E., Oro R., Yao Q. A., Hu T. C., Carlson A. R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*. 2001. Vol. 120, No. 3. P. 379–385. doi: 10.1023/A:1017564100823.
6. 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.
7. Purnhauser L. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat *Triticum aestivum* callus cultures by copper. *Cereal Research Communications*. 1991. Vol. 19. No. 4. P. 419–424.
8. Honseh R., Mendel R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. Vol. 12, No. 3. P. 259–266. doi: 10.1016/j.plb.2009.05006.
9. Bednarek P. T., Orłowska R. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2020. Vol. 140, No. 2. P. 245–257. doi: 10.1007/s11240-01901724-1.
10. Dahleen L. S. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1995. Vol. 43, No. 3. P. 267–269. doi: 10.1007/BF00039954.
11. Castillo A. M., Valles M. P., Cistue L. Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica*. 2000. Vol. 113. P. 1–8. doi: 10.1023/A:10039337530907.
12. Bednarek P. T., Orłowska R. Time of *in vitro* anther culture may moderate action of copper and silver ions that affect the relationship between DNA methylation change and the yield of barley green regenerants. *Plants*. 2020. Vol. 9, No. 9. 1064. doi: 10.3390/plants9091064.
13. Jacquard C., Wojnarowicz G., Clement C. Anther culture in barley. In: Doubled haploid production in crop plants. Ad. M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht : Kluwer academic publishers, 2003. P. 20–27.
14. Yruela I. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* 2009. Vol. 36, 5. P. 409–430. doi: 10.1071/FP08288.
15. 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.

BILYNSKA O. V.

Yuriev Plant Production Institute of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Heroiv Kharkova Ave., 142

EVALUATING THE EFFECT OF CUPRIC SULPHATE ON MORPHOGENIC STRUCTURE INDUCTION AND PLANT REGENERATION IN SPRING BARLEY ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aim. Investigation was aimed to ascertain possibility to increase the efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro* by addition of cupric sulphate to the solution for cut tiller cold pretreatment and by increase of cupric sulphate concentrations in the media for morphogenic structure induction and plant regeneration. **Methods.** Cut tillers were cold pretreated for 5 days at 4°C in water and in the solutions contained 5 µM and 10 µM of cupric sulphate. Isolated anthers were cultivated on agar solidified nutrient medium containing N6 macro-and MS micronutrients, physiologically active substances, maltose (9.0 %) and on the media with increased (10 µM) content of cupric sulphate. **Results.** No effect of cupric sulphate addition on cut tiller viability and morphogenesis in anther culture *in vitro* was found. The lowest plant regeneration frequency was obtained when cupric sulphate was added both to inductive and regenerative media. **Conclusions.** Addition of cupric sulphate to the pretreatment solution as well as increase of this microelement concentration (up to 10 µM) in the nutrient media can't be considered as the methodological approach suitable to enhance the efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., anther culture *in vitro*, nutrient medium, cupric sulphate, morphogenic anthers, plant regeneration.