

МОРФОГЕНЕТИЧНИЙ ЕФЕКТ І ТРОФІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНОГО КРОХМАЛЮ Д-5АМ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ПИЛЯКІВ ТА ІЗОЛЬОВАНИХ ЗАРОДКІВ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО (*HORDEUM VULGARE* L.)

З метою створення ефективного, з низькою вартістю вітчизняного загусника живильних середовищ для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів впродовж 2006–2013 рр. нами було проведено вивчення гелеутворюючих властивостей і морфогенетичного ефекту близько 30-ти препаратів хімічно модифікованого крохмалю, створених в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України [1, 2].

Результати цих досліджень засвідчили позитивний вплив на культуру пиляків *in vitro* ячменю ярого заміни агар-агару деякими препаратами у середовищі для індукції новоутворень, який полягав у стимулюванні прямого ембріодогенезу, збільшенні за рахунок цього частоти регенерації та зниженні частки вітрифікованих рослин [3, 4]. Показано також, що застосування крохмалів як гелеутворювачів дозволяє використовувати сахарозу замість високовартісної мальтози в індукційному середовищі [5], забезпечуючи у такий спосіб значний економічний ефект.

Апробація розробки на генетично різноманітному гібридному матеріалі підтвердила істотне зростання виходу гаплоїдів ячменю порівняно з агаровим середовищем [6], що є свідченням можливості та доцільності її впровадження у селекцію для швидкого одержання константного вихідного матеріалу.

У зв'язку з отриманими результатами, значний інтерес з теоретичної та практичної точок зору становить питання про механізм стимулюючої дії крохмалів на перебіг процесів індукції новоутворень і регенерації рослин. Зокрема, на увагу заслуговує оцінка трофічних властивостей крохмалів різної природи, пов'язана у тому числі з біодоступністю препаратів.

З огляду на це, метою досліджень було визначення ефективності отримання гаплоїдів ячменю ярого у культурі пиляків *in vitro* за використання як гелеутворювача живильного середовища хі-

мічно модифікованого крохмалю Д-5аМ та оцінка впливу заміни агар-агару цим препаратом на ріст і розвиток рослин у культурі ізольованих зародків ячменю ярого за наявності та відсутності у середовищі трофічного вуглеводного компонента.

Матеріали і методи

Для отримання андрогенних гаплоїдів було залучено F_1 гібридів 11-ти комбінацій схрещування нових сортів української селекції з лініями-носіями гена *ix*, дібраними із зразка GSHO18288193444 за результатами цитологічного аналізу на наявність у пилку крохмалю амілопектинового типу. Як матеріал для досліджень з ембріокультури було використано сорт ячменю ярого Вакула селекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН.

Вирощування вихідного матеріалу проводили на дослідній ділянці (сівба – ручною саджалкою, відстань між рядками – 15 см, між рослинами – 5 см). Вегетаційний період 2014 р. був в цілому сприятливим для росту і розвитку ячменю у фазі кушіння та вихід в трубку. Але в період добору колосся для вилучення пиляків спостерігалось підвищення денної температури повітря до 31 °С. Добирали колосся з мікроспорами у середній та пізній фазах розвитку, визначених цитологічним аналізом за допомогою мікроскопа МБИ-11 на тимчасових препаратах пиляків, забарвлених 2 %-м розчином карміну у 45 %-й оцтовій кислоті.

Попередню обробку колосся для вилучення пиляків проводили шляхом витримування пагонів у воді при температурі 4 °С у холодильнику впродовж 4–5 діб. Стерилізацію рослинного матеріалу здійснювали, обробляючи колосся у листовій піхві 70%-м етиловим спиртом від 10 до 20 хв.

Для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMSмод.

2 [7, 8], яке було модифіковане шляхом вилучення з його складу розчинного картопляного крохмалю та заміни агар-агару препаратом хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ у концентрації 12,0 %, отриманим за удосконаленою технологією в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ.

Це середовище містило солі макроелементів середовища N6 [9], солі мікроелементів середовища MS [10] і такі компоненти: 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота) – 2,0 мг/л; БАП (6-бензиламінопурин) – 0,5 мг/л; V_1 – 1,0 мг/л; V_6 і PP – по 0,5 мг/л; гліцин – 2,0 мг/л; аланін і пролін – по 100,0 мг/л; міо-інозитол – 100,0 мг/л (усі реактиви виробництва «Serva», Німеччина); глутамін («PRS-CODEX», Іспанія) – 200,0 мг/л; лактальбумін («Difco», США) – 300,0 мг/л; мальтозу («Merck», Німеччина) – 90,0 г/л; картопляний екстракт – 20,0 %; рН 5,7–5,8.

Схемою досліду з вивчення трофічних властивостей крохмалю передбачалося культивування ізолюваних зародків на середовищах з різними гелеутворювачами за наявності та відсутності сахарози. Зокрема, як контроль було використано мінімальне середовище MS [10], яке містило 30 г/л сахарози і 0,8 % агар-агару. У трьох дослідних варіантах зі складу агарового середовища було вилучено сахарозу, агар-агар замінено на хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ у концентрації 12,0 %, із середовища, яке містило крохмаль, було вилучено сахарозу.

Асептичну культуру ізолюваних зародків отримували шляхом обробки зернівок у фазі воскової стиглості миючим засобом «Domestos» (концентрація 50,0 %, тривалість обробки 10 хв), з подальшим промиванням у трьох змінах стерильної дистильованої води. На середовище висаджували диференційовані зародки розміром 3–4 мм по 20–25 шт у кожному варіанті досліду.

Калюси та ембріоїди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS, яке містило по 0,5 мг/л вітамінів V_1 , V_6 і PP, 100 мг/л міо-інозитолу, по 0,2 мг/л БАП та ІОК («Serva», Німеччина), 200 мг/л глутаміну («PRS-CODEX», Іспанія), 3,0 % сахарози («Merck», Німеччина), 0,8 % агар-агару («Difco», США), рН 5,6–5,7.

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин у відсотках від загально-го числа культивованих пиляків. Трофічні властивості крохмалів у культурі ізолюваних зародків

визначали за кількістю пророслих зародків (у відсотках від культивованих) через 7 діб та довжиною проростків у мм через на 7 і 14 діб від початку культивування. Результати експериментів було оброблено за допомогою дисперсійного аналізу та методів варіаційної статистики [11] з використанням пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

Результати та обговорення

Оскільки результати досліджень з порівняльного вивчення ефективності застосування хімічно модифікованого крохмалю Д-5а, його аналога Д-5аМ і агар-агару у складі живильних середовищ для культивування пиляків ячменю ярого, проведені у 2012 і 2013 рр. на генетично різноманітному матеріалі, засвідчили беззаперечні переваги середовищ з крохмалем щодо індукції морфогенних структур і регенерації рослин [6], у досліді з отримання гаплоїдів було використане середовище, гелеутворюючий компонент якого був представлений крохмалем Д-5аМ. На агарове середовище пиляки не висаджували.

Дослідження показали, що андрогенні структури – калюси та ембріоїди – утворилися у всіх комбінаціях схрещування, залучених до експерименту (рис. 1, табл.).

Середня частота морфогенних пиляків становила 32,21 % при варіюванні від 19,89 % до 40,88 %. Максимальний вихід морфогенних пиляків було отримано у комбінації схрещування F_1 GSHO(их) / Екзотик, де батьківською формою слугував чутливий до андрогенезу *in vitro* сорт. Ще дві гібридні комбінації за участі чутливої до андрогенезу *in vitro* лінії ДГ00-126 мали близькі показники кількості морфогенних пиляків.

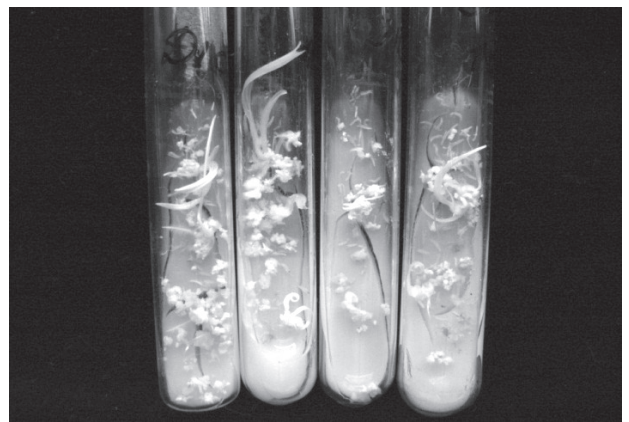


Рис. 1. Індукція новоутворень у культурі пиляків *in vitro* F_1 гібридів ячменю ярого на середовищі з хімічно модифікованим крохмалем Д-5аМ

Таблиця

Отримання андрогенних структур і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* F₁ гібридів ячменю ярого (2014 р.)

Комбінація схрещування	Висаджено пиляків, шт.	Отримано			
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
		шт.	%	шт.	%
Всесвіт / GSHO-5(wx)	310	122	39,35	40	12,90
Інклюзив / GSHO-5(wx)	492	99	20,12	25	5,08
GSHO-7 (wx) / ДГ00-126	528	190	35,98	100	18,99
GSHO-7 (wx) / Вакула	639	193	30,20	49	7,67
Фенікс / GSHO-7(wx)	357	105	29,41	39	10,92
GSHO-5 (wx) / ДГ00-126	232	81	34,91	61	26,29
GSHO-7 (wx) / Взірець	670	214	31,94	43	6,41
GSHO-4 (wx) / ДГ00-126	304	120	39,47	30	9,87
GSHO-4 (wx) / Модерн	191	38	19,89	9	4,71
GSHO-2 (wx) / Екзотик	406	166	40,88	25	6,15
GSHO-5 (wx) / Вакула	295	97	32,88	26	8,81
НІР ₀₅	–	–	6,33	–	4,11
Разом	4424	1425	–	447	–
Середнє	–	–	32,21 ± 0,70	–	10,10 ± 0,45

Усі гібриди були здатними до регенерації нормально пігментованих рослин (рис. 2). Середня частота регенерації зелених рослин була на рівні 10 %. За частотою регенерації зелених рослин – 26,29 % – виділилася гібридна комбінація за участі лінії

ДГ00-126. За культивування 4424 пиляків отримано 447 нормально пігментованих рослин-регенерантів.

Трофічні властивості крохмалю Д-5аМ було досліджено у іншій експериментальній системі – культурі *in vitro* ізольованих зародків, зважаючи на їхню амілолітичну активність при проростанні [12]. Спостереження за ембріокультурою показало, що наявність чи відсутність сахарози мали

істотний вплив на проростання зародків на агарових середовищах (рис. 3).

Натомість на середовищі, яке містило крохмаль без сахарози, спостерігався компенсаторний ефект. Особливо помітним він був при визначенні довжини проростків на 7-у і 14-у добу від інокуляції зародків на живильне середовище (рис. 4).

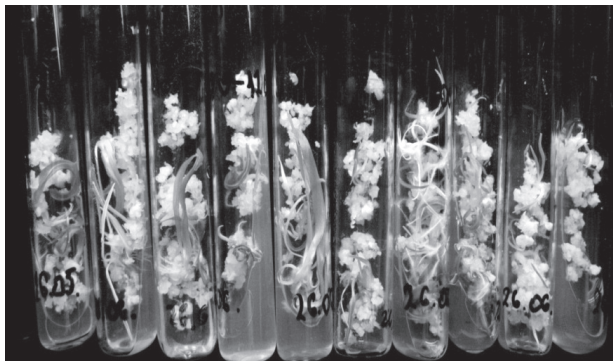
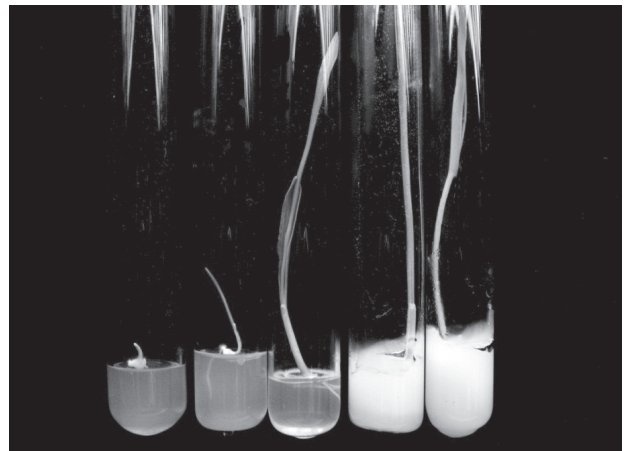
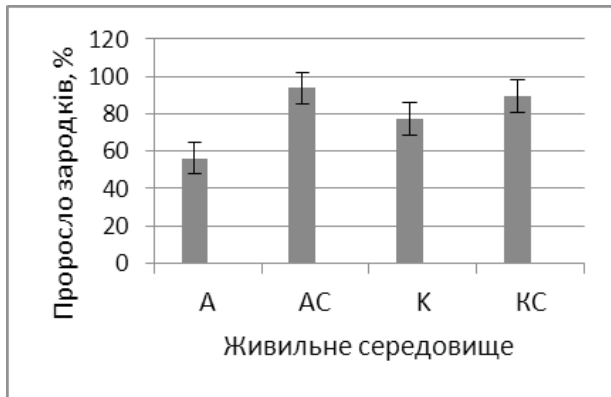


Рис. 2. Масова регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* F₁ гібридів ячменю ярого з новоутворень, отриманих на індукційному середовищі з хімічно модифікованим крохмалем Д-5аМ

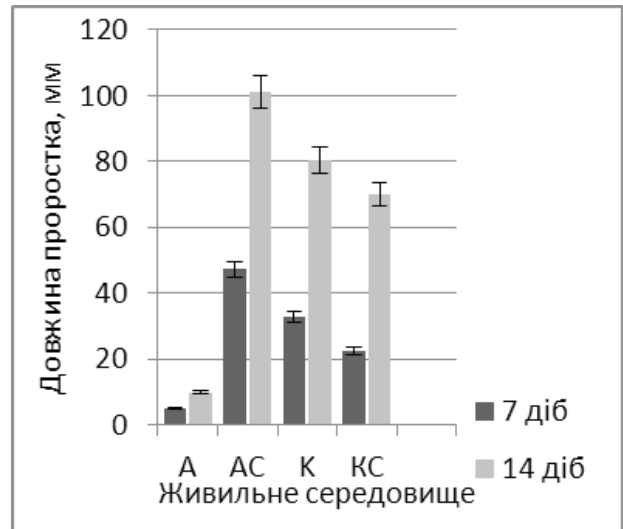


А А АС К КС

Рис. 3. Проростки ячменю ярого (сорт Вакула), отримані у культурі ізольованих зародків через 7 діб після інокуляції на живильні середовища з мінеральною основою MS та різним гелеутворювачем і вмістом сахарози: А – 0,8 % агар-агар; АС – 0,8 % агар-агар + 3,0 % сахароза; К – 12,0 % хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ; КС – 12,0 % хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ + 3,0 % сахароза



а



б

Рис. 4. Проростання ізолюваних зародків (а) і довжина проростків (б) ячменю ярого (сорт Вакула) у культурі *in vitro* на живильних середовищах з мінеральною основою MS, які різнилися гелеутворюючим компонентом і вмістом сахарози (позначення ті ж, що на рис. 3)

Таким чином, підтверджено можливість заміни агар-агару на хімічно модифікований крохмаль у середовищі для культивування пиляків ячменю ярого. Вперше досліджено трофічні властивості хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ у культурі ізолюваних зародків *in vitro*. Отримані результати є непрямим доказом того, що крохмаль у культурі *in vitro* піддається ферментативному гідролізу. Моносахариди, які утворюються під дією амілаз зародків і тканин пиляків, а також при термічній стерилізації середовища, очевидно, слугують додатковим джерелом вуглеводного живлення гетеротрофної культури, а також сприяють підтриманню осмотичного тиску, що позитивно впливає на морфогенез у культурі пиляків *in vitro*.

Висновки

Заміна агар-агару у середовищі для культивування пиляків ячменю ярого на хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ сприяла масовому утворенню андрогенних структур з високою регенераційною здатністю. У культурі ізолюваних зародків ячменю ярого мав місце компенсаторний ефект крохмалю Д-5аМ за відсутності у складі живильного середовища сахарози. Активний ріст проростків і рослин на живильному середовищі з крохмалем без сахарози дозволяє розглядати цей гелеутворювач як перспективний для масового отримання садивного матеріалу інших видів рослин і довготривалого зберігання рослин у банках генетичних ресурсів.

ЛІТЕРАТУРА

- Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – 39, № 2. – С. 136–143.
- Білинська О.В., Дульнев П.Г. Хімічно модифіковані крохмалі як чинники морфогенезу у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю // Тези доповідей II Міжнародної наукової конференції «Регуляція росту і розвитку фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти», 11–13 жовтня 2011 р. – Харків: Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, 2011. – С. 55–56.
- Білинська О.В., Тымчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезинова О.Ю. Оцінка морфогенетичного ефекту природних і хімічно модифікованих крохмалів у складі середовища для отримання гаплоїдів ярого ячменю методом культури пиляків *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2010. – 9. – С. 214–219.
- Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами // Физиология и биохимия культурных растений. – 2012. – 44, № 5. – С. 440–448.
- Білинська О.В. Вплив гелеутворюючих і поживних вуглеводних компонентів живильного середовища на індукцію гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* Науковий вісник національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2009. – Вип. 1. – С. 91–98.
- Білинська О.В., Дульнев П.Г. Вплив гелеутворюючого компонента живильного середовища на ефективність отримання гаплоїдів ячменю ярого (*Hordeum vulgare* L.) у культурі пиляків *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – 15. – С. 20–24.

7. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.
8. Білинська О.В. Штучні живильні середовища для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2009. – Вип. 1. – С. 91–98.
9. 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.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
11. Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Московского университета, 1964. – 367 с.
12. Акаева М.М., Фурсов О.В. Синтез, активация и секреция б-амилазы алейронового слоя щитка зерновки пшеницы // Физиология растений. – 1990. – 37, вып. 6. – С. 1180–1185.

BILYNSKA O.V.¹, **DULNYEV P.G.**²

¹ Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av. 142, e-mail: bilinska@ukr.net

² Institute of bioorganic and oil chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske h., 50, e-mail: selit@ua.fm

MORPHOGENIC EFFECT AND TROPHIC CAPACITIES OF CHEMICALLY MODIFIED STARCH D-5aM IN SPRING BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) ANTHHER CULTURE *IN VITRO* AND EMBRYO CULTURE

Aims. Investigation of gelling capacities and morphogenetic effect of more than 30 chemically modified starches resulted in selection of preparations possessing such positive characteristics as a promotion of direct embryo formation in spring barley anther culture *in vitro*, improvement of plant regeneration and decrease a rate of plant vitrification. The aim of the study was to determine the effect of chemically modified starch D-5aM on spring barley haploid production and germination of embryos isolated from seeds when trophic carbohydrate sucrose was absent in a medium. **Methods.** Plants were grown under field conditions. Anthers were isolated from spikes of F_1 hybrids of 11 crosses. Inductive media for anther culture *in vitro* based on N6 and MS salts were solidified with chemically modified starch D-5aM. Control media for embryo culture contained MS salts, agar and sucrose. Experimental variants included agar without sucrose, chemically modified starch D-5aM with sucrose and without one. **Results.** It was conformed positive effect of agar substitution for less costly chemically modified starch on spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. It was also revealed that agar solidified sucrose free medium had visible negative influence on embryo germination and seedling growth. At the same time a compensatory effect was shown on sucrose free starch solidified medium. **Conclusions.** Chemically modified starch D-5aM used as a gelling agent of the medium for anther culture *in vitro* promoted induction of structures with a high regeneration capacity and had positive effect on embryo germination and seedling growth in sugar free medium for embryo culture. This perspective preparation is recommended for application in plant biotechnology. The most promising field of application is considered to be a clonal micropropagation and long term *in vitro* plant cultivation in gene banks.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., barley, anther and embryo culture *in vitro*, agar, chemically modified starch, morphogenesis.