

УДК 633.16:224.234

БЛИНСЬКА О.В.^{1✉}, ДУЛЬНЄВ П.Г.²¹ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,
Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net² Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України,
Україна, 02160, м. Київ, Харківське шосе, 50, e-mail: dulnev@bpci.kiev.ua

✉ bilinska@ukr.net, (068) 566-03-20

**ВПЛИВ ТРОФІЧНИХ, ОСМОТИЧНО АКТИВНИХ ТА ГЕЛЕУТВОРЮВАЛЬНИХ
КОМПОНЕНТІВ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ПРЯМИЙ ЕМБРІОІДОГЕНЕЗ
У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ЯРОГО ЯЧМЕНЮ**

Мета. Ембріодогенез, або соматичний ембріогенез, є найбільш ефективним шляхом регенерації рослин у культурі *in vitro* клітин, тканин та органів. Мета досліджень полягала у визначенні впливу на частоту прямого ембріодогенезу у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю трофічних та осмогенних речовин індукційного живильного середовища і встановленні механізму стимулювальної дії на морфогенез хімічно модифікованого крохмалю за його використання як гелеутворювача замість агар-агару. **Методи.** Пиляки лінії ДГ00-126 культивували на живильних середовищах, які містили солі макро- і мікроелементів відповідно за прописами N6 та MS, фізіологічно активні речовини, мальтозу або манітол (0,3 М), агар-агар або хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ. **Результати.** Підтверджено позитивний вплив поєднання мальтози і хімічно модифікованого крохмалю на процеси індукції й регенерації у культурі пиляків ярого ячменю. Встановлено, що манітол не підтримує процеси росту і розвитку у пиляковій культурі та ембріокультурі ярого ячменю, але й не є токсичним. **Висновки.** Необхідною умовою забезпечення високої ефективності індукційних процесів у культурі пиляків ярого ячменю є наявність у середовищі мальтози – низькомолекулярного компонента, що має водночас трофічну і осмогенну активність. **Ключові слова:** *Hordeum vulgare* L., культура пиляків *in vitro*, мальтоза, манітол, ембріодогенез, регенерація.

Як відомо, основними показниками, які характеризують ефективність експериментального андрогенезу *in vitro*, є кількість морфогенних пиляків, тобто пиляків із видимими на їх поверхні калюсом чи ембріодами, та рослин-

регенерантів у відсотках від загальної кількості пиляків, висаджених на живильне середовище. Ці андрогенні макроструктури формуються за рахунок аномального розвитку мікроспор, які пройшли через етапи багаторазового поділу і утворили замість пилякових зерен, що містять вегетативну клітину і два спермії, багатоклітинні проембріо або первинні калюси [1].

Цілком природно, що кінцевий результат – частота регенерації гаплоїдних рослин – визначається не лише кількістю ініційованих до андрогенного розвитку мікроспор, але й залежить від життєздатності і регенераційного потенціалу похідних від них багатоклітинних утворень, які, в свою чергу, залежать від дії численних факторів різної природи. Так, було встановлено позитивний вплив на ініціацію андрогенезу у культурі пиляків ячменю осмотичних чинників, зокрема, попередньої обробки пиляків у 0,3 М розчині манітолу [2] та додавання до індукційного середовища інертного у метаболічному відношенні для ячменю дисахариду мелібіози [3]. Однак останній методичний прийом виявився ефективним лише за використання як загусника середовища ячмінного крохмалю, який, на відміну від агар-агару, мав трофічні властивості: продукти його гідролізу – мальтоза і глюкоза – слугували джерелом енергії та вуглецю на етапах індукції та диференціації ембріодів

Важливість високого осмотичного потенціалу живильного середовища для отримання стабільних показників гаплопродукції було підтверджено і у проведених нами раніше дослідженнях. Зокрема, було встановлено, що зменшення концентрації мальтози в агаровому індукційному живильному середовищі з 9,0 % до 6,0 % призвело до істотного зниження частоти

індукції андрогенних структур, в той час як додавання до середовища, яке містило 6,0 % мальтози, 0,1 М манітолу, що було практично еквімолярним 3,0 % мальтози, мало компенсаторний ефект [4]. Позитивний вплив на перебіг андрогенезу *in vitro*, збільшення осмотичного потенціалу за рахунок додавання 0,1 М манітолу було показано і для середовищ на основі препарату крохмалю Д-5аМ, який мав трофічні властивості [5]. Більш того, ця модифікація, застосована на тлі високої концентрації мальтози, сприяла не лише зростанню кількості морфогенних структур, але й значному підвищенню частоти регенерації зелених рослин шляхом прямого ембріодогенезу [6].

Оскільки наведені експериментальні дані було отримано за одночасного використання у складі середовищ мальтози і манітолу, заслуговує на увагу питання щодо їх диференційного впливу на андрогенез *in vitro* та внеску гелеутворювачів із трофічними властивостями у загальний стимулювальний ефект. З огляду на це метою досліджень було з'ясування ролі осмотичних і трофічних чинників у стимулюванні андрогенезу *in vitro* у ячменю на середовищах, які різнилися гелеутворювачем, за повної заміни мальтози манітолом в еквімолярній концентрації, а також оцінка впливу манітолу на морфогенез у культурі ізольованих зародків.

Матеріали і методи

Для отримання культури пиляків *in vitro* було використано лінію ярого ячменю андрогенного походження ДГ00-126, створену на основі гібридної популяції Екзотик×Харківський 74, яка за результатами багаторічних досліджень характеризувалася високими частотами ембріодогенезу та регенерації зелених рослин [6]. До експерименту з культивування *in vitro* ізольованих зародків було залучено сорт ярого ячменю Вакула селекції СГІ-НЦНС (м. Одеса).

Рослини-донори експлантів вирощували у польових умовах за дотримання загальноприйнятих вимог агротехніки. Колосся добирали у момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку, яку визначали на тимчасових препаратах пиляків, забарвлених 2%-м розчином карміну у 45%-й оцтовій кислоті. Попередню обробку колосся проводили шляхом витримання пагонів у воді за температури 4⁰С у холодильнику впродовж 5–6 діб. Стерилізацію

рослинного матеріалу здійснювали, обробляючи колосся у листовій піхві 70 %-им етиловим спиртом упродовж 10–15 хв.

Як базове і контроль для культивування пиляків *in vitro* було використано розроблене нами середовище NMSмод. 2 [7], яке містило разом з іншими компонентами 9,0 % мальтози («Merck», Німеччина) і 0,8 % агар-агару («Difco», США). Дослідні варіанти передбачали культивування пиляків на живильних середовищах, які різнилися вмістом мальтози 9,0 % ($\approx 0,3$ М) і манітолу (0,3 М) та гелеутворювачем (агар-агар – 0,8 % і хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ – 12,0 %). Загалом дослід передбачав чотири варіанти.

Калюси та ембріоїди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS [8], яке містило по 0,5 мг/л вітамінів В₁, В₆ і РР, 100 мг/л міоїнозиту, 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 («Ferak», США), рН 5,6–5,7.

Можливий негативний вплив манітолу досліджували у культурі ізольованих зародків, яку отримували за власною методикою (заявка на одержання патенту а 20170177). Живильні середовища містили: 0,8 % агар-агару (перший варіант); 0,8 % агар-агару + 3,0 % сахарози (другий варіант); 0,8 % агар-агару + 0,1 М манітолу (третій варіант); 0,8 % агар-агару + 3,0 % сахарози + 0,1 М манітолу (четвертий варіант), 0,8 % агар-агару + 3,0 % сахарози + 0,3 М манітолу (п'ятий варіант). У складі середовищ були відсутні солі макро- та мікроелементів.

Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків. В ембріокультурі ефект певних компонентів середовища визначали за кількістю пророслих зародків (у відсотках від числа культивованих) та довжиною проростків у мм на сьому та чотирнадцяту добу від початку культивування. На середовище у кожному варіанті висаджували від 15 до 18 диференційованих зародків розміром від 3 мм до 4 мм.

Істотність різниці між дослідними варіантами визначали за допомогою методів варіаційної статистики і дисперсійного аналізу за використання пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

Результати та обговорення

Загальновідомо, що агар-агар – універсальний загусник живильних середовищ – не утилізується культурою *in vitro* різних експлантів і видів рослин. Результати експерименту з культивування пиляків засвідчили, що манітол для ячменю є абсолютно інертною у біохімічному відношенні речовиною і його використання в агаровому середовищі як єдиного джерела вуглецю є недоцільним через повне пригнічення морфогенезу (рис. 1, табл.).

Наразі нами було підтверджено раніше встановлений факт щодо можливості отримання морфогенетичної відповіді у культурі пиляків ячменю за вилучення із складу середовищ, загущених крохмалю, мальтози [5], що вказує

на трофічні властивості крохмалю і поглинання продуктів його термічного і ферментативного гідролізу експлантами. Але частоти утворення морфогенних структур і рослин-регенерантів на середовищі без трофічного вуглеводного компонента (див. табл., варіант 12,0 % Д-5аМ) були вдвічі нижчими, ніж у контролі. Додавання до такого середовища 0,3 М манітолу (варіант 12,0 % Д-5аМ + 0,3М манітолу) не призвело до істотного зростання інтенсивності процесу індукції морфогенних структур, хоча й мала місце тенденція до підвищення гаплопродукційних показників. Натомість кращим виявився варіант дослідів «9,0 % мальтози + 12,0 % Д-5аМ», що було цілком очікувано, виходячи з результатів раніше проведених досліджень [5, 10].



а) б) в) г) д)

Рис. 1. Індукція морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 на середовищах, які різнилися трофічним, осмогенним і гелеутворювальним компонентами: а) 9,0 % мальтози + 0,8 % агар-агару (контроль); б) 0,3 М манітол + 0,8 % агар-агару; в) 9,0 % мальтози + 12,0 % Д-5аМ; г) 12,0 % Д-5аМ; д) 12,0 % Д-5аМ + 0,3 М манітол.

Таблиця. Андрогагенез *in vitro* у лінії ярого ячменю ДГ00-126 залежно від вмісту у живильному середовищі для культивування пиляків мальтози і манітолу та природи гелеутворювача, 2017 р.

Вміст мальтози та манітолу у базовому середовищі MNSмод. 2, гелеутворювач	Висаджено пиляків, шт.	Отримано				
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів		
		шт.	%	шт.	% ¹	% ²
9,0 % мальтози + 0,8 % агар-агару (контроль)	352	149	42,33	117	33,24	78,52±2,18
9,0 % мальтози + 12,0 % Д-5аМ	487	202	41,48	211	41,47	104,45
0,3 М манітол + 0,8 % агар-агару	353	0	0,00	0	0,00	0,00
12,0 % Д-5аМ	346	66	19,08	55	15,89	83,32±2,00
12,0 % Д-5аМ + 0,3М манітол	363	75	20,66	67	18,45	89,33±1,63
НІР ₀₅	–	–	5,81		5,67	–

Примітки: 1 – відсоток від кількості пиляків; 2 – відсоток від кількості морфогенних пиляків.

Із метою винятку можливого негативного впливу манітолу на ріст і розвиток рослин ячменю було досліджено проростання ізольованих зародків і динаміку збільшення довжини проростків на агарових середовищах, які різнилися вмістом сахарози і манітолу. Як видно з рис. 2 і 3, манітол у концентрації 0,1 М і 0,3 М за додавання до агарового середовища, яке містило 3,0 % сахарози, не був токсичним для проростків ячменю.

Спостереження показали, що на середовищі, яке містило лише агар-агар, зародки впродовж 14 діб залишалися без змін, у той час як додавання 0,1М манітолу призвело до «проростання» зародків (частота – 88 % на 14-ту добу) у вигляді порожніх прозорих колеоптилів із середньою довжиною 5 мм. Цікаво, що додавання 0,1М і 0,3 М манітолу до середовища з сахарозою стимулювало розвиток коренів (рис. 2).

Експериментальні дані свідчать про важливість для отримання високої ефективності індукційних процесів, тобто переходу мікроспор на спорофітний шлях розвитку, наявності у середовищі низькомолекулярного компонента, що має водночас трофічну й осмотичну активність. Очевидно, що стимулювальний ефект хімічно модифікованих крохмалів на морфогенез у культурі пиляків ярого ячменю полягає у покращенні якісних характеристик андрогенних структур, а саме у збільшенні частки ембріодів або глобулярних проембрію з високою потенційною здатністю до диференціації в ембріоди та до проростання останніх на регенераційному середовищі з утворенням рослин. Це досягаєть-

ся, з одного боку, за рахунок ферментативного гідролізу крохмалю, що стає додатковим резервним джерелом живлення після 20–30-ти діб від початку культивування, коли вичерпуються більш доступні сахароза чи мальтоза, а з іншого – через поступове зневоднення гелю.

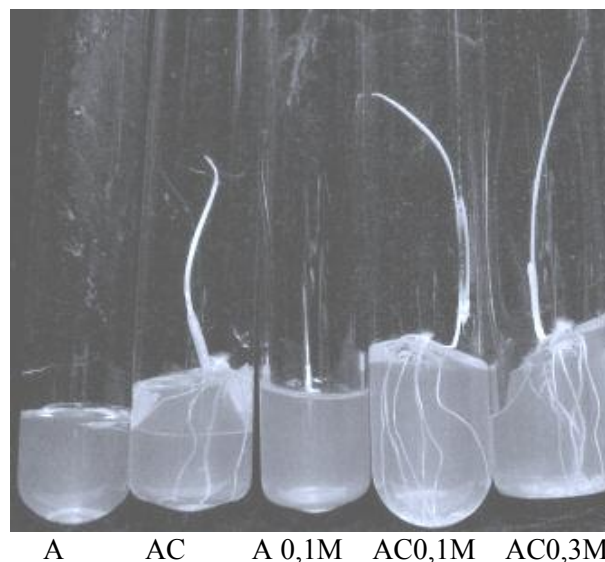
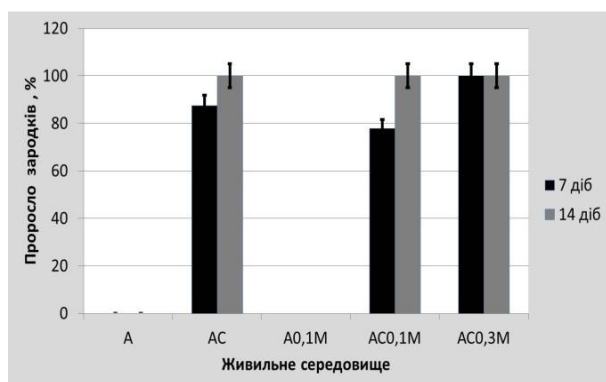
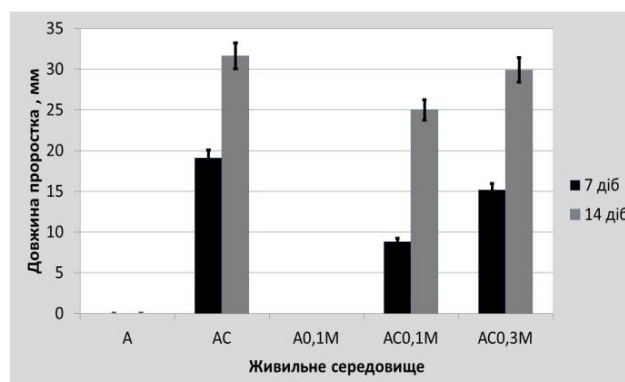


Рис. 2. Проростки ячменю ярого (сорт Вакула), отримані у культурі ізольованих зародків через сім діб після інкуляції, на живильних середовищах, які різнилися вмістом сахарози і манітолу: А – 0,8 % агар-агар; АС – 0,8 % агар-агар+3,0 % сахарози; А0,1М – агар-агар+0,1 М манітол; АС0,1М – 0,8 % агар-агар+0,1 М манітол+ 3,0 % сахарози; АС0,3М – 0,8 % агар-агар+0,3 М манітол+ 3,0 % сахарози.



а)



б)

Рис. 3. Проростання ізольованих зародків (а) та довжина проростків (б) ярого ячменю (сорт Вакула) на живильних середовищах, які різнилися вмістом сахарози і манітолу через 7 і 14 діб після інкуляції (позначення ті ж, що на рис. 2).

Варто зазначити, що менша водоутримувальна здатність гелю на основі крохмалю призводить до поступового підвищення його щільності, а це певною мірою моделює зменшення вмісту води в ендоспермі у процесі диференціації зародка [11]. Дуже важливим є те, що більша щільність гелю з крохмалю сприяє пригніченню росту крихкого обводненого неморфогенного калюсу, на який із високою частотою перетворюються глобулярні структури на агаровому середовищі. Підтвердженням цього може слугувати істотно вища частота регенерації нормально пігментованих рослин у відсотках від кількості морфогенних пиляків – 104,4 % – на середовищі, яке містило 9,0 % мальтози і 12,0 % хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ, а також високі значення цього показника на середовищах, загущених крохмалю, одне з яких не містило трофічного вуглеводного компонента, а до іншого було додано лише осмотичний компонент в еквімолярній концентрації.

Висновки

Необхідною умовою забезпечення високої ефективності індукції спорофітного розвитку мікроспор у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю була наявність у середовищі мальтози – низькомолекулярного компонента, що має водночас трофічну та осмотичну активність. Заміна мальтози манітолом в еквімолярній концентрації призвела до повного пригнічення морфогенезу у середовищі, загущеному агар-агаром, та до істотного зменшення інтенсивності процесу індукції на середовищі, яке містило хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ. Позитивний ефект крохмалю на ембріодогенез полягав у пригніченні росту неморфогенного калюсу за рахунок збільшення щільності середовища та забезпечення андрогенних структур додатковим джерелом живлення, що сприяло більш повній реалізації їх морфогенного потенціалу.

Література

1. Bergen S., Wang M. Microspore regeneration as a tool for plant breeding. *Acta Horticulture*. 2002. No. 572. P. 51–57. doi: 10.17660/Acta Horticulture.2002.572.5.
2. Roberts-Oehlschlager S. L., Dunwell J.M. Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990. Vol. 20, No. 3. P. 235–240. doi: 10.1007/BF00041887.
3. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media. *Plant Breeding*. 1987. Vol. 99, No. 2. P. 161–171. doi: 10.1111/j1439-0523.1387.tb01167.x.
4. Білінська О.В. Вплив низькомолекулярних осмотичних речовин на індукцію ембріодогенезу у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. праць. К.: Логос, 2017. Т. 20. С. 164–167.
5. Білінська О.В., Дульнев П.Г. Морфогенетичний ефект і трофічні властивості хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ у культурі *in vitro* пиляків та культурі ізольованих зародків ячменю ярого. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. праць. К.: Логос, 2015. Т. 17. С. 107–111.
6. Bilynska O.V. Effect of low molecular weight osmogenic substances and solidifying agent of the medium on barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Plant Cells in vitro: Fundamentals and Applications II*: Book of Abstracts of international conference (Vienna, Austria, 26–27 Jun 2017). Vienna: VISCEA, 2017. P. 38.
7. Belinskaya E. V. Inheritance of potential for *in vitro* androgenesis in spring barley. *Cytology and Genetics*. 2008. Vol. 42, No. 4. P. 237–245. doi: 10.3103/S009545270804004X.
8. 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. Т. 39, № 2. С. 136–143.
9. 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.
10. Білінська О.В. Вплив гелеутворюючих і поживних вуглеводних компонентів живильного середовища на індукцію гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. *Науковий вісник НУБіП України*. 2009. Вип. 132. С. 17–24.
11. Lersten N.R. Flowering plant embryology. Ames (USA): Blackwell Publishing, 2004. 212 p.

References

1. Bergen S., Wang M. Microspore regeneration as a tool for plant breeding. *Acta Horticulture*. 2002. No. 572. P. 51–57. doi: 10.17660/Acta Horticulture.2002.572.5.
2. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media. *Plant Breeding*. 1987. Vol. 99, No. 2. P. 161–171. doi: 10.1111/j1439-0523.1387.tb01167.x.
3. Roberts-Oehlschlager S.L., Dunwell J.M. Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990. Vol. 20, No. 3. P. 235–240. doi: 10.1007/BF00041887.
4. Bilynska O.V. Effect of low molecular weight osmogenic substances on the induction of embryogenesis in spring barley anther culture *in vitro*. *Factors in experimental evolution of organisms*. Kyiv: Logos, 2017. Vol. 20. P. 164–167 (in Ukrainian).
5. Bilynska O.V., Dulnyev P.G. Morphogenic effect and trophic capacities of chemically modified starch D-5aM in spring barley

- (*Hordeum vulgare* L.) anther culture *in vitro* and embryoculture. *Factors in experimental evolution of organisms*. Kyiv: Logos, 2015. Vol. 17. P. 107–111 (in Ukrainian).
6. Bilynska O.V. Effect of low molecular weight osmogenic substances and solidifying agent of the medium on barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Plant Cells in vitro: Fundamentals and Applications II*: Book of Abstracts of international conference (Vienna, Austria, 26–27 Jun 2017). Vienna: VISCEA, 2017. P. 38.
 7. Belinskaya E.V. Inheritance of potential for *in vitro* androgenesis in spring barley. *Cytology and Genetics*. 2008. Vol. 42, No. 4. P. 237–245. doi: 10.3103/S009545270804004X.
 8. Belinskaya E.V., Dulnyev P.G. Modified starch dkkmod as a component of nutrient medium for barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 2007. Vol. 39, No. 2. P. 136–143 (in Russian).
 9. 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.
 10. Bilynska O.V. Effect of solidifying and trophic carbohydrate components of nutrient medium on barley haploid induction in anther culture *in vitro*. *Naukovyi visnyk of NUBiP of Ukraine*. 2009. Is. 132. P. 17–24 (in Ukrainian).
 11. Lersten N.R. Flowering plant embryology. Ames (USA): Blackwell Publishing, 2004. 212 p.

BELINSKAYA E.V.¹, DULNYEV P.G.²

¹ Plant Production Institute n. a. V.Ya. Yuriev of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovskiyi ave., 142, e-mail: bilinska@ukr.net

² Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 02160, Kiev, Kharkivske h., 50, e-mail: dulnev@bpci.kiev.ua

EFFECT OF TROPIC, OSMOTICALLY ACTIVE AND SOLIDIFYING COMPONENTS OF NUTRIENT MEDIUM ON THE DIRECT EMBRYOGENESIS IN SPRING BARLEY ANTHHER CULTURE *IN VITRO*

Aim. Embryoidogenesis, or somatic embryogenesis, is known to be the most efficient mode of plant regeneration in plant cell, tissue and organ culture. The investigation was aimed to elucidate effects of trophic and osmogenic components of inductive medium on the frequency of direct embryoidogenesis in spring barley anther culture *in vitro* and to determine mechanism of morphogenesis improvement coursed by chemically modified starch D-5aM used as a gelling agent instead of agar. **Methods.** Anthers of DH-line with a high androgenetic capacity were inoculated on inductive media containing N6 macro-, MS micronutrients, organic supplements, maltose or mannitol (0.3 M) and solidified with agar or chemically modified starch. **Results.** A positive effect of combination of high maltose content and chemically modified starch on the induction and regeneration processes in spring barley anther culture *in vitro* was confirmed. It was also shown that mannitol didn't keep any growth or development processes going in barley anther and embryo culture, but at the same time this substance had no toxic effect. **Conclusions.** In order to achieve a high frequency of induction in spring barley anther culture, it is necessary to use medium containing maltose – a low weight component both with trophic and with osmotic activity.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., anther culture *in vitro*, mannitol, maltose, embryo formation, plant regeneration.