

БІЛИНСЬКА О.В.*Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України,
Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilynskaov@gmail.com, (068) 566-03-20***ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ОСМОГЕННИХ РЕЧОВИН НА ІНДУКЦІЮ
ЕМБРІОІДОГЕНЕЗУ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ЯРОГО ЯЧМЕНЮ**

Відомо, що у реалізації програми морфогенезу рослин, закодованій у їх геномі, і у прояві різноманітних фізіологічних функцій велику роль відіграють не лише хімічні, а й осмотичні градієнти [1]. Ці градієнти утворюються завдяки різниці концентрацій сполук різної хімічної природи – солей макро- і мікроелементів, вуглеводів, амінокислот, продуктів вторинного метаболізму – всередині клітини і зовні та у провідній системі рослини, представленій флоемою і ксилемою [2]. Осмотичний потенціал протопласта клітини забезпечує її життєздатність за рахунок активного і пасивного транспорту іонів і накопичення специфічних метаболітів з осмогенною активністю [3]. Зміна осмотичного потенціалу призводить до виникнення полярності та асиметричного поділу зиготи, що має велике значення для ініціації початкових етапів морфогенезу [4].

Варто зазначити, що осмотичний тиск живильного середовища є важливим фактором для культивування рослинних клітин, тканин та органів *in vitro*. З огляду на це живильні середовища збалансовані за складом мінеральних і органічних компонентів, концентрація яких створює близькі до ізотонічних умови для росту і розвитку експлантів. При цьому значний внесок у формування осмотичного потенціалу середовища вносить сахароза – основний вуглеводний компонент живильних середовищ [5]. І якщо для культивування соматичних клітин і тканин практично усіх видів рослин оптимальною концентрацією сахарози є 3 %, то для генеративних клітин існує видова залежність щодо потреби у цьому вуглеводі. Зокрема, представники родини злакових *Gramineae* (*Poaceae*), а також хрестоцвітних *Brassicaceae* потребують високих концентрацій сахарози (6–10 %) для переходу мікроспор на спорофітний шлях розвитку і регенерації гаплоїдних рослин [6].

Для ячменю, що належить до родини злакових і є не лише економічно важливою сільськогосподарською культурою, а й модельним видом для дослідження теоретичних і методич-

них питань експериментального андрогенезу *in vitro*, було доведено переваги використання як вуглеводного компонента живильного середовища мальтози замість сахарози [7]. А у подальших дослідженнях було встановлено, що на середовищах, які містили замість агар-агару ячмінний крохмаль, трофічний вуглеводний компонент може бути замінений на вуглеводи, що не утилізуються, а виконують функцію підтримання необхідного осмотичного тиску середовища, наприклад, на мелібіозу [8].

Для підвищення осмотичного тиску живильних середовищ також використовують манітол – шестиатомний спирт, який є широко розповсюдженим метаболітом водоростей, грибів, а також накопичується та утилізується багатьма видами вищих рослин [9]. Так, описано вдалу спробу застосування середовища з манітолом для підвищення регенераційного потенціалу соматичних тканин кукурудзи [10]. Окрім цього, манітол виявився придатним для попередньої обробки колосся [11] і пиляків [12] ячменю для отримання культури ізольованих мікроспор. Результати досліджень показали, що під дією манітолу відбувається затримка процесу подвоєння хромосом гаплоїдних мікроспор, що має велике значення в разі їх використання як реципієнтної системи для генетичної трансформації [13], а позитивний ефект цього осмоліту на ембріодогенез у культурі соматичних і генеративних клітин викликаний збільшенням вмісту абсцизової кислоти [14].

Нами вперше досліджено вплив попередньої обробки колосся ярого ячменю у 0,3 М розчині манітолу для отримання асептичної культури пиляків, визначено оптимальну тривалість процедури і доведено її позитивний вплив на ефективність отримання гаплоїдів [15, 16]. Метою цього дослідження було з'ясування можливості підвищення регенераційної здатності культури пиляків ярого ячменю шляхом додавання манітолу до складу живильного середовища на тлі різних концентрацій мальтози.

Матеріали і методи

Моделним генотипом слугувала лінія ярого ячменю андрогенного походження ДГ00-126, отримана на основі гібридної популяції Екзотик×Харківський 74, яка за результатами багаторічних досліджень характеризувалася високими частотами ембріодогенезу та регенерації зелених рослин [17]. Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах за дотримання загальноприйнятих вимог агротехніки. Гідротермічний режим 2016 року впродовж фаз кушення, вихід у трубку та колосіння був сприятливим для росту і розвитку рослин ярого ячменю. Колосся добирали у момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку. Попередню обробку колосся проводили шляхом витримання пагонів у воді при температурі 4 °С 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 використане розроблене нами середовище NMSмод. 2 [18], яке містило разом з іншими компонентами 9,0 % мальтози («Merck», Німеччина) і 0,8 % агар-агару («Difco», США). Дослідні варіанти експерименту передбачали культивування пиляків на живильних середовищах, які різнилися вмістом мальтози (0–9,0 %) і були доповнені манітолом (Китай) у концентрації 0,1 М.

Калюси та ембріоїди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS [19], яке містило по 0,5 мг/л вітамінів В₁, В₆ і РР, 100 мг/л міо-інозиту, по 0,2 мг/л БАП та ІОК («Serva», Німеччина), 200 мг/л глютаміну («PRS-CODEX», Іспанія), 3,0 % сахарози («Merck», Німеччина), 0,8 % агар-агару («Ferak», США), рН 5,6–5,7.

Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків. Для статистичної обробки результатів досліджень застосовано методи варіаційної статистики і дисперсійний аналіз.

Результати та обговорення

Спостереження показали, що на агаровому середовищі за відсутності мальтози мало місце практично повне пригнічення процесів індукції і регенерації у культурі пиляків *in vitro*

ярого ячменю (рис. 1). Негативним чинником морфогенезу виявилось також зниження концентрації мальтози з 9,0 % до 6,0 % (рис. 2). Додавання до індукційного середовища, яке містило 6,0 % мальтози, 0,1 М манітолу сприяло істотному (майже вдвічі) зростанню кількості морфогенних пиляків і утворенню великої кількості глобулярних структур. Дещо несподіваним було те, що за більш високої концентрації мальтози (9,0 %) збільшення осмотичного потенціалу середовища за рахунок введення до його складу манітолу істотно не вплинуло на показники гаплопродукції (рис. 1 а).

Слід зазначити, що за обох досліджених концентрацій мальтози додавання манітолу сприяло гальмуванню росту неморфогенного калюсу на індукційному середовищі. Але перенесення новоутворень на регенераційне середовище, яке містило 3,0 % сахарози, призвело до активації росту саме такого типу калюсу.

Зменшення у середовищі вмісту мальтози з 9,0 % до 6,0 % мало наслідком істотне зменшення частоти регенерації рослин (рис. 1 б).

Натомість додавання до цього середовища 0,1 М манітолу виявилось нівелюючим фактором, про що свідчить відсутність істотних відмінностей за частотою регенерації на середовищі ММ6 (6,0 % мальтози+0,1 М манітол) і на середовищі, яке містило 9,0 % мальтози (М9). І хоча зростання частоти регенерації рослин на середовищі ММ6 порівняно з М6 (з 11,3 до 16,7 %, $HP_{05}=4,67$) було істотним, воно не відповідало збільшенню частоти морфогенних пиляків (відповідно з 28,5 до 52,9 %, $HP_{05}=6,26$), що було, вірогідно, пов'язано з тим, що нижчий рівень забезпечення вуглеводного живлення не дозволив цим глобулярним структурам повною мірою диференціюватися в ембріоїди. Водночас на тлі високої концентрації мальтози вплив манітолу на частоту регенерації рослин був відсутній.

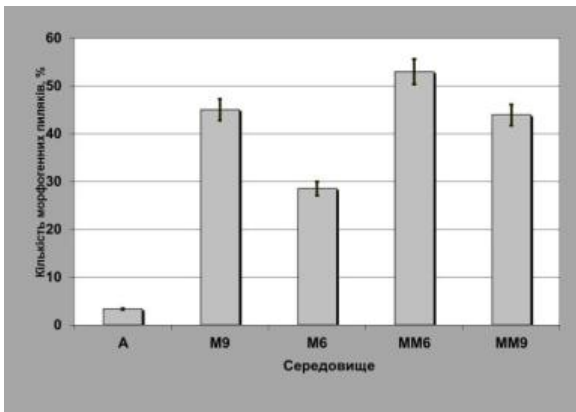
Слід зазначити, що концентрація манітолу 0,1 М була обрана, виходячи з розрахунку різниці між вмістом мальтози 6,0 % і 9,0 %, адже 30 г/л мальтози становить приблизно 0,1 М. Імовірно, що 9,0 % є концентрацією мальтози, яка забезпечує оптимальний осмотичний тиск. Його збільшення за рахунок додавання манітолу викликає осмотичний стрес, до якого, однак, клітини виявляють толерантність, не знижуючи істотно здатність до проліферації, утворення ембріоїдів і регенерації рослин. Можна припустити, що більш високі концентрації манітолу у

живильному середовищі будуть придатними для створення системи добору клітин і рослин-регенерантів, стійких до осмотичного стресу і посухи.

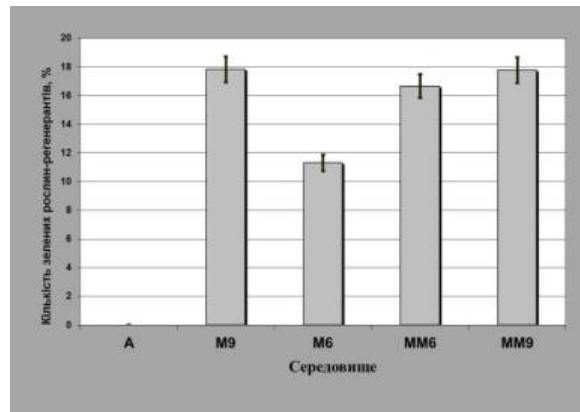
Висновки

Вилучення зі складу агарового живильного середовища для культивування пиляків ярого ячменю мальтози – дисахариду з трофічною та осмогенною активністю – призвело практично до повного пригнічення процесів індукції анд-

рогенних структур і регенерації рослин. Помітний негативний вплив на ці показники чинило і зменшення концентрації мальтози з 9 % до 6 %. Натомість додавання манітолу у концентрації 0,1 М до середовища, яке містило 6 % мальтози, сприяло істотному підвищенню частоти утворення ембріоїдів, ембріогенних структур і рослин-регенерантів, що свідчить про значний вплив осмотичного потенціалу середовища на морфогенез у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю.



а)



б)

Рис. 1. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 на живильних середовищах, які різнилися вмістом мальтози і манітолу: А – агар-агар (0,8 %); М9 – мальтоза (9,0 %); М6 – мальтоза (6,0 %); MM6 – мальтоза (6,0 %) + манітол (0,1 М); MM9 – мальтоза (9,0 %) + манітол (0,1 М).

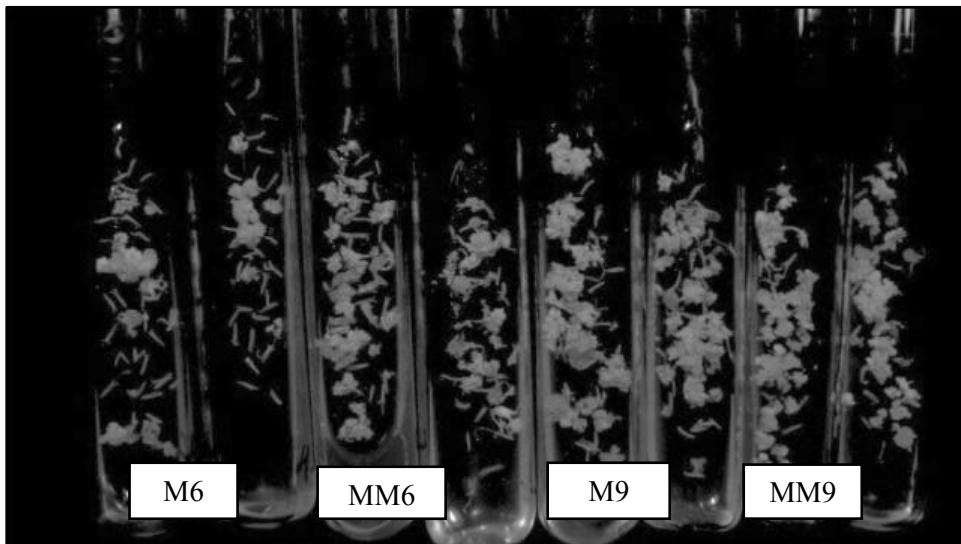


Рис. 2. Утворення морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю (лінія ДГ00-126) на агарових живильних середовищах, які різнилися вмістом мальтози і манітолу (позначення ті ж, що на рис. 1).

Література

1. Sterward F.C., Mohn Ram H.Y. Determining factors in cell growth: some implications for morphogenesis in plant // *Advan. Morphogenesis*. – 1961. – V. 1. – P. 180–266.
2. Воробьев Л.Н. Регулирование ионного транспорта: теоретические и практические аспекты минерального питания растений. Итоги науки и техники ВИНТИ. Серия Физиология растений. – 1988. – Т. 5. – 160 с.
3. Кларксон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки / Пер. с англ. М.Г. Дудиной; под ред. Д.Б. Вахмистрова. – М.: Мир, 1973. – 368 с.
4. Lersten N.R. Flowering plant embryology. – Ames: Blackwell Publishing, 2004. – 212 p.
5. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В.И. Негрука; с предисл. р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
6. Dunwell J.M. Anther and ovary culture // *Cereal tissue and cell culture*. – Dordrech: Martinus Nijhof, 1985. – P. 1–44.
7. Finnie S.J., Powell W., Dyer A.F. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant breeding*. – 1989. – V. 103, N 2. – P. 110–118. doi: 10.1111/j. 1439-0523.1989.tb00358.x.
8. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media // *Plant Breeding*. – 1987. – V. 99, N 2. – P. 161–171. doi: 10.1111/j.1439-0523.1387.tb01167.x.
9. Кретович В.Л. Биохимия растений: Учеб. – 2-е изд., перераб. и доп.; для биол. спец. ун-тов. – М.: Высш. шк., 1986. – 503 с.
10. Абраїмова О.Є., Деркач К.В., Сатарова Т.М., Шевченко Н.В., Черноусова Н.М. Вплив манітолу на індукцію та регенерацію морфогенної калусної тканини у кукурудзи // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. – К.: Логос, 2016. – Т. 17. – С. 103–106.
11. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley // *Euphytica*. – 2001. – V. 120, N 3. – P. 379–385. doi:10.1023/A:1017564100823.
12. 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. – V. 20, N 3. – P. 235–240. doi: 10.1007/BF00041887.
13. Shim Y.S., Kasha K.J. The influence of pretreatment on cell stage progression and the time of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores // *Plant Cell Reports*. – 2003. – V. 21, N 11. – P. 1065–1071. doi: 10.1007/s00299-003-0635-4.
14. Bergen S., Wang M. Microspore regeneration as a tool for plant breeding // *Acta Horticulture*. – 2002. – N 572. – P. 51–57. doi: 10.17660/Acta Hort.2002.572.5.
15. Белинская Е.В. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2005. – Т. 37, № 5. – С. 436–442.
16. Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 437–444.
17. Белинская Е.В. Влияние элементов технологии гаплоидной индукции на проявление генотипических особенностей морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* ярого ячменя // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 2. – С. 38–44.
18. 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.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. – 1962. – V. 15. – P. 473–497. doi: 10/1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

BILYNSKA O.V.

Plant Production Institute nd. a. V. Ya. Yuriev National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av., 142, e-mail: bilynskaov@gmail.com

EFFECT OF LOW MOLECULAR WEIGHT OSMOGENIC SUBSTANCES ON THE INDUCTION OF EMBRYOGENESIS IN SPRING BARLEY ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aim. Osmotic pressure of nutrient medium is known to be an important factor for morphogenesis in plant cell, tissue and organ culture *in vitro*. The investigations was aimed to elucidate the effect of maltose concentration and to evaluate the impact of mannitol add on callus, embryoid formation and plant regeneration in spring barley anther culture *in vitro*.

Methods. Anthers of DH-line with a high androgenetic capacity were inoculated on inductive media contained N6 macro-, MS micronutrients, organic supplements, maltose (0–9.0 %) and 0.1 M mannitol. **Results.** A decrease in maltose concentration from 9 to 6 % had a strong negative effect on these processes. At the same time, addition of 0.1 M mannitol to medium containing 6 % maltose promoted sufficiently increase the efficiency of embryoid formation and plant regeneration. **Conclusions.** Medium osmotic pressure mainly determined by a high maltose concentration played an important role in spring barley haploid production. Decrease in maltose content could be compensated by addition of mannitol, which is osmotic substance with low metabolic activity.

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