

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕАЛІЗАЦІЮ МОРФОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО (*HORDEUM VULGARE* L.) У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Регулятори росту рослин – природні та синтетичні фітогормони – є обов'язковим компонентом переважної більшості живильних середовищ для культивування *in vitro* клітин, тканин та органів. Про важливість цих фізіологічно активних речовин для індукування морфогенезу свідчить той факт, що на тлі відносної універсальності базового складу середовищ за мінеральною основою (на практиці для різних об'єктів використовується досить обмежена кількість прописів – MS [1], B5 [2], N6 [3] та інші) і деякими трофічними компонентами стосовно конкретного виду, сорту чи експланту має місце варіювання саме за вмістом фітогормонів [4, 5].

Ще на перших етапах становлення культури *in vitro* як методу дослідження закономірностей росту і розвитку рослин було показано, що якісний, кількісний склад та співвідношення ауксинів і цитокінінів у середовищі відіграють ключову роль у регуляції процесів дедиференціації, диференціації і регенерації [6]. Експериментально підтверджено, у тому числі на модельних трансгенних рослинах зі зміненим рівнем ендogenousних фітогормонів, можна вважати положення про те, що основою регуляції морфогенетичних реакцій у різних системах *in vitro* є взаємодія ендogenousних і екзогенних гормональних факторів [7, 8].

У зв'язку з цим заслуговують на увагу результати досліджень із визначення вмісту природного ауксину індолил-3-оцтової кислоти (ІОК) у пиляках сортів пшениці ярої з подальшим культивуванням на середовищах із різним вмістом найбільш придатного для індукції андрогенних гаплоїдів у злаків синтетичного ауксину 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), які свідчать про те, що генотипи з різним вмістом ендogenousного ауксину мали неоднакову потребу в екзогенному регуляторі росту ауксинової дії для стимулювання ембріодогенезу. Зокрема, була встановлена закономірність більш активного формування ембріодів у генотипів із високим ендogenousним вмістом ауксину на середовищах, що

містили низьку концентрацію 2,4-Д. І, навпаки, у сортів пшениці ярої з низьким вмістом ендogenousного ауксину збільшення у середовищі концентрації 2,4-Д сприяло зростанню частоти ембріодогенезу [9]. Очевидно, ці факти не лише сприяють поглибленню знань щодо причин генотипної залежності морфогенезу *in vitro*, а й відкривають реальні можливості для її зменшення за рахунок удосконалення складу середовищ за регуляторами росту.

З огляду на це, метою досліджень було визначення ефективності індукції морфогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* трьох генотипів ячменю ярого, контрастних за андрогенною здатністю, залежно від природи та концентрації регуляторів росту.

Матеріали і методи

Лінія андрогенного походження ДГ00-126 та сорти ячменю ярого (*Hordeum vulgare* L.) селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Екзотик і Фенікс було використано як модельні генотипи, зважаючи на результати досліджень із визначення їхньої здатності до утворення калюсу, ембріодів і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* [10]. При цьому до уваги було взято особливості морфогенезу цих генотипів, які полягали в тому, що лінія ДГ00-126 характеризувалася високими частотами ембріодогенезу та регенерації зелених рослин, сорт Фенікс мав низькі показники гаплопродукції, а сорту Екзотик був притаманний низький вихід рослин-регенерантів на тлі високої здатності до калюсогенезу.

Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах за дотримання загальноприйнятих вимог агротехніки. Досліди проведено у 2012, 2014 і 2015 рр. Добір колосся та отримання асептичної культури пиляків проводили за описаними раніше методиками [11, 12]. Як контроль було використано живильне середовище NMS мод. 2 [12], яке містило 2,0 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л БАП (6-бензиламінопурин), «Serva», Німеччина. До-

слідні варіанти містили: 0,5 мг/л 2,4-Д і 2,0 мг/л БАП; 1,0 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л БАП; 1 мг/л БАП. Також до схеми досліду було включено варіант середовища без регуляторів росту. В одному з дослідних варіантів було проведено стерилізацію середовища NMS мод. 2 шляхом фільтрування. Решту середовищ стерилізували в автоклаві за тиску $7,8 \cdot 10^4$ Па впродовж 20 хв.

Калюси та ембріоїди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS, яке містило по 0,5 мг/л вітамінів B₁, B₆ і PP, 100 мг/л міо-інозиту, по 0,2 мг/л БАП та ІОК («Serva», Німеччина), 200 мг/л глутаміну («PRS-CODEX», Іспанія), 3,0 % сахарози («Merck», Німеччина), 0,8 % агару («Difco», США), рН 5,6–5,7.

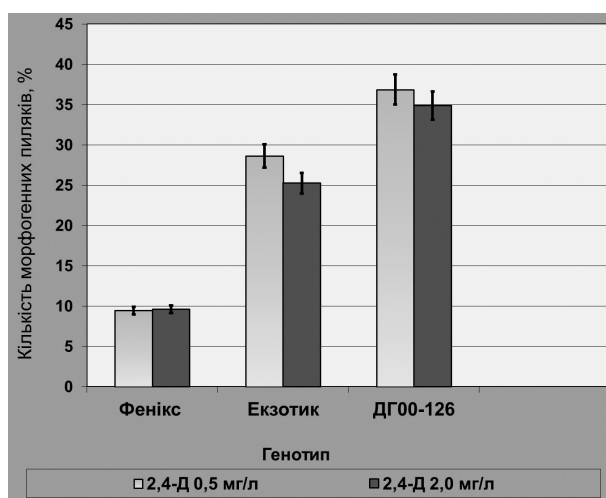
Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за такими показниками, як кількість морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків. Для статистичної обробки результатів досліджень застосовано методи варіаційної статистики.

Результати та обговорення

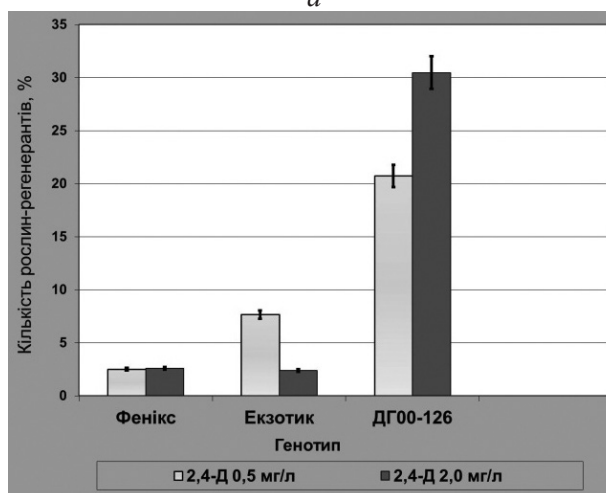
Результати досліджень, які було проведено на трьох генотипах із різною здатністю до андрогенезу *in vitro* (рис. 1), засвідчили, що, незалежно від вмісту 2,4-Д у живильному середовищі, генотипи зберегли притаманні їм ранги за здатністю продукувати андрогенні структури (калюси та ембріоїди) і рослини-регенеранти.

Більш того, зменшення вмісту 2,4-Д з 2,0 мг/л до 0,5 мг/л істотно не вплинуло на кількість морфогенних пиляків у жодного генотипу, а у сорту Фенікс – і на частоту регенерації рослин. У чутливого до андрогенезу *in vitro* генотипу – лінії ДГ00-126 – відбулося зменшення кількості рослин-регенерантів при зниженні концентрації 2,4-Д. Натомість, єдиним позитивним наслідком використання ауксину у концентрації 0,5 мг/л замість 2,0 мг/л було підвищення частоти регенерації рослин у сорту Екзотик (з 2,38% до 7,66%), якому притаманна така особливість морфогенезу у культурі пиляків *in vitro*, як низька регенераційна здатність на тлі високої частоти індукції андрогенних структур.

Вилучення із складу середовища 2,4-Д (рис. 2, табл.) не мало істотного впливу на індукцію морфогенних структур у генотипу з високою андрогенною здатністю на протигагу генотипу з низькою реакцією на культивування пи-



а



б

Рис. 1. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого на живильних середовищах, які різнилися вмістом 2,4-Д



0 мг/л 2,4-Д 2,0 мг/л 2,4-Д

Рис. 2. Індукція андрогенних структур у культурі пиляків *in vitro* лінії ячменю ярого ДГ00-126 на середовищах, які різнилися вмістом 2,4-Д

Андрогенез *in vitro* у ячменю ярого в залежності від генотипу та вмісту 2,4-Д у живильному середовищі для культивування пиляків

Генотип	Вміст 2,4-Д, мг/л	Висаджено пиляків, шт.	Отримано			
			морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
ДГ00-126	2,0	342	84	24,56±2,33	60	17,54±2,06**
	0	263	56	28,51±2,78	7	2,66±0,99
Фенікс	2,0	330	45	13,64±1,89**	11	3,33±0,99
	0	329	0	0,00	0	0,00

Примітка: ** – різниця істотна при $P \leq 0,01$.

ляків *in vitro*, у якого цей процес був повністю заблокований.

Поряд із цим на безгормональному середовищі у лінії ДГ00-126 помічено багаторазове зниження частоти регенерації рослин, пов'язане з переважанням серед новоутворень неморфогенного, імовірно, гормоннезалежного калюсу, який і при перенесенні на середовище для регенерації характеризувався активним ростом. Заслугує на увагу те, що високочутливий генотип на безгормональному середовищі та генотип низькочутливий за наявності 2,4-Д у концентрації 2,0 мг/л мали практично однакову і досить низьку частоту регенерації рослин (табл.).

Наступним етапом досліджень було з'ясування особливостей морфогенезу у культурі пиляків двох генотипів ячменю ярого з контрастною андрогенною здатністю за наявності у середовищі лише цитокініну БАП, а також за різного співвідношення 2,4Д і БАП.

Результати експерименту (рис. 3), показали, що у генотипу з високою андрогенною здатністю – лінії ДГ00-126 – вилучення із складу середовища 2,4-Д з одночасним збільшенням концентрації БАП до 1,0 мг/л, як і додавання цих стимуляторів росту у концентрації 1,0 мг/л та зменшення вмісту 2,4-Д до 0,5 мг/л на тлі збільшення вмісту БАП до 2,0 мг/л, призвели до істотного зниження частоти індукції андрогенних структур і зменшення частоти регенерації зелених рослин.

У сорту Фенікс, якому притаманна низька чутливість до андрогенезу *in vitro*, кращі показники гаплопродукції було отримано за відсутності у середовищі 2,4-Д і наявності БАП у концентрації 1,0 мг/л. Саме використання БАП як єдиного регулятора росту в такій концентрації рекомендовано у деяких протоколах з отримання гаплоїдів ячменю [13, 14]. Однак найбільш результативним позитивним чинником морфогенезу у культурі пиляків *in vitro* лінії ДГ00-126 (на сорті Фенікс цей варіант не застосовували) виявилася

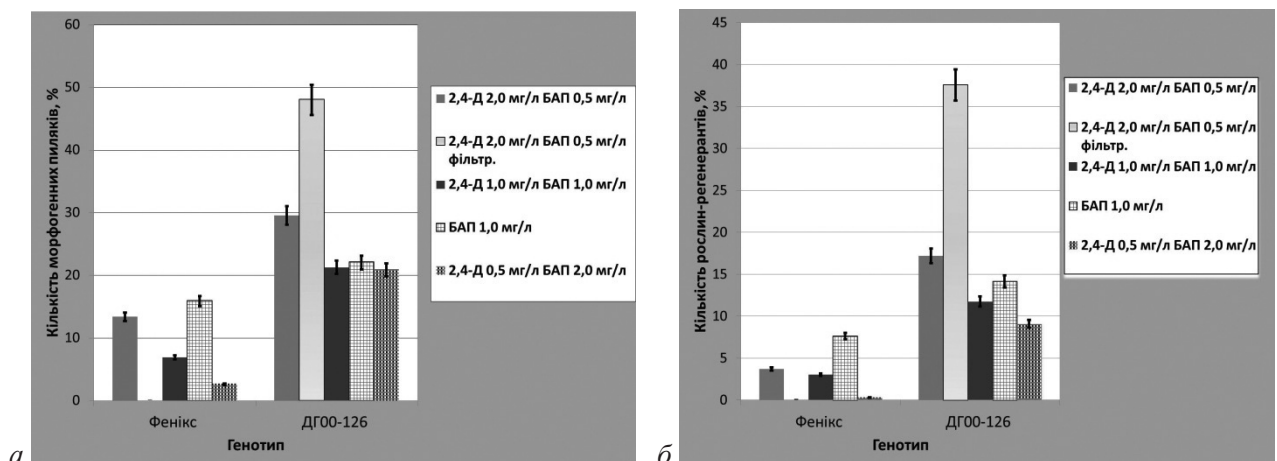


Рис. 3. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого на живильних середовищах з різним вмістом 2,4-Д і БАП

стерилізація середовища шляхом фільтрування, що, зважаючи на термостабільність 2,4-Д і відносну термостабільність БАП [15], може вказувати на істотний вплив на індукцію андрогенних структур та їх регенераційну здатність інших наявних у середовищі фізіологічно активних і трофічних компонентів, які зазнають деструктивних змін за дії високої температури при автоклавованні. Про важливу роль у регуляції морфогенезу негормональних факторів свідчать і проведені нами раніше дослідження, у ході яких було встановлено, що гелеутворюючі компоненти живильного середовища, представлені природними і хімічно модифікованими крохмалями, чинили більший позитивний ефект на гаплопродукційні показники, ніж регулятори росту [16].

До особливостей морфогенезу, індукованого на живильних середовищах із різним вмістом 2,4-Д і БАП, слід віднести такі. На середовищі, яке містило 1 мг/л БАП, практично у кожній пробірці з пиляками обох генотипів було помічено появу хоча б однієї рослини, яка утворилася внаслідок прямого ембріодогенезу до моменту пересадки андрогенних структур на регенераційне середовище, і менш активне наростання неембріогенного калюсу. Ця тенденція спостерігалася, але була менш виражена на середовищі, яке містило 2,4-Д і БАП в однаковій концентрації – 1,0 мг/л. Збільшення концентрації БАП до 2,0 мг/л разом із зменшенням вмісту 2,4-Д до 0,5 мг/л не призвело до стимулювання прямого ембріодогенезу. У чутливого до андрогенезу *in vitro* генотипу ДГ00-126 прямий ембріодогенез і проростання ембріодів було помічено на усіх середовищах, але з різною частотою.

Отже, у проведеному експерименті не вдалося нівелювати генотипні відмінності шляхом зменшення вмісту ауксину і підвищення вмісту БАП в індукційному живильному середови-

щі, хоча у сортів Фенікс та Екзотик було отримано позитивний ефект за рахунок цих модифікацій. Це узгоджується з результатами робіт щодо удосконалення методики отримання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* за рахунок зміни композиції фітогормонів [17, 18], включаючи власні багаторічні дослідження з вивчення чинників експериментального андрогенезу *in vitro* [19]. Оскільки нами не проводилося визначення кількості ендогенного ауксину у тканинах пиляків досліджуваних генотипів, отримані результати не можуть бути використані для підтвердження чи спростування положення щодо зв'язку між вмістом цього класу регуляторів росту в експлантах і живильному середовищі. Але, напевно, поряд із «гормональним» механізмом генотипної залежності реакції на культивування *in vitro* існують і інші, пов'язані з експресією окремих кластерів генів [20] і особливостями метаболізму як спорофітних тканин пиляків, так і безпосередньо мікроспор.

Висновки

Варіювання складу живильного середовища для культивування пиляків ячменю ярого за регуляторами росту ауксинової та цитокінінової дії не призвело загалом до зміни рангів генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro*. У генотипу з високою андрогенною здатністю вилучення регуляторів росту не вплинуло на частоту індукції андрогенних структур, але знизило вихід рослин-регенерантів через переважне утворення неморфогенного калюсу. Генотип із низькою реакцією на культивування пиляків потребував наявності 2,4-д чи бап в індукційній фазі андрогенезу *in vitro*, причому кращі гаплопродукційні показники було отримано саме на середовищі з цитокініном бап за його використання як єдиного регулятора.

ЛІТЕРАТУРА

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
2. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Experimental Cell Research.* – 1968. – 50. – P. 151–158.
3. 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.
4. Kevers C. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture // *In vitro Cell. Dev. Biol.* – 1996. – 32. – P. 272–289.
5. Lăpădătescu S., Petoscu C., Velicevici G., Băla M. *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on ornamental plants // *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology.* – 2012. – 16 (2). – P. 203–205.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
7. Phytohormones in plant biotechnology. Proceedings of the NATO-Russia Workshop, 12–16 May, 2003 / Eds. I. Macháková, I. Romanov. – Berlin: Springer+Science media, 2003. – 259 p.

8. Kefeli V.I., Kalevitch M. Natural growth inhibitors and phytohormones in plants and environment / Ed. B. Borsari. – Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 2003. – 331 p.
9. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др.; отв. ред И.И. Шамров. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
10. Белинская Е.В. Создание признакововой коллекции ячменя по способности к андрогенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – 5 (1, 2). – С. 11–20.
11. Білінська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». – Х., 1997. – 19 с.
12. 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.
13. Jähne-Gärtner A., Lörtz H. Protocols for anther and microspore culture of barley // Methods in Molecular Biology // Plant Cell Culture Protocols / Ed. R.D. Hall. – Totowa: Yumana Press Inc., 1995. – 111. – P. 269–271.
14. Cistue L., Vallés M.P., Echavarrri B., Castillo A. Barley anther anther culture // Doubled haploid production in crop plants. / Ads. M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 29–34.
15. Growth Regulators – Plant Tissue Culture Protocol [Electronic resource]. – 2016. – Mode of access: <http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html>.
16. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Сравнительная оценка морфогенетического эффекта в культуре пыльников *in vitro* ярового ячменя гелеобразующих и физиологически активных веществ // Тезисы докладов IX научной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология», Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. – М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 40–41.
17. Liang G.H., Xu A., Tang H. Direct generation of wheat haploids via anther culture // Crop Science. – 1987. – 27. – P. 336–339.
18. Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // Agricultural and food Science in Finland. – 1998. – 6. – P. 389–398.
19. Белинская Е. В. Влияние элементов технологии гаплоидной индукции на проявление генотипических особенностей морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* ярового ячменя // Цитология и генетика. – 2010. – 44 (2). – С. 38–44.
20. Muñoz-Amatrian M., Svensson J.T., Castillo T.J., Vallés M.P. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino production // Func. Integr. Genomics. – 2009. – 9 (3). – P. 311–323.

BILYNSKA O.V.

Yuriev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av., 142, e-mail: bilynska_genetics@yuriev.com.ua

EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON REALIZATION OF SPRING BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) MORPHOGENIC POTENTIAL IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aim. Growth regulators (natural and synthetic phytohormones) are known to be an important factor for morphogenesis in plant cell, tissue and organ culture *in vitro*. It has been shown that genotypic differences for androgenetic ability could be explained by discrepancy between endo- and exogenous phytohormone contents. From this point of view, genotypic dependence would be overcome via adjustment of media hormone composition. Investigations aimed to elucidate responses of genotypes with different *in vitro* androgenetic ability to auxin- and cytokinin-active growth regulator contents in inductive medium. **Methods.** Plants were grown under field conditions. Anthers were isolated from spikes of two spring barley cultivars and DH-line and inoculated on inductive media contained N6 macro-, MS micronutrients, organic supplements and different concentrations of 2.4-D and BAP. **Results.** Genotypic dependence of response to plant growth regulator composition in nutrient medium for anther culture *in vitro* was confirmed. It was ascertained that genotype with high androgenetic capacity did not require auxin for androgenetic structure induction unlike genotype with low expression of this trait. The best yield of androgenetic structures and plants was obtained on the filter sterilized media with combination of 2.4-D 2.0 mg/L and BAP 0.5 mg/L. **Conclusions.** Regardless of auxin- and cytokinin-active growth regulator contents and their ratios, androgenetic capacity ranks of genotypes remained unchanged. As methodological approach aimed to overcome genotypic dependence cultivation of anthers isolated from spikes of genotypes with contrast androgenetic ability on media containing different growth regulator content has been appeared ineffective.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., spring barley, anther culture *in vitro*, growth regulators, morphogenesis.