

БІЛИНЬСЬКА О. В.<sup>1</sup>✉, ДУЛЬНЄВ П. Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України,

Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

<sup>2</sup> 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

### ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ IN VITRO НА ОСНОВІ ГІБРИДНОГО МАТЕРІАЛУ: ПОРІВНЯННЯ БАЗОВОЇ ТА УДОСКОНАЛЕНОЇ ТЕХНОЛОГІЙ

**Мета.** Оцінювання ефективності застосування інноваційних методичних підходів, розроблених на модельних генотипах, для отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* на основі генетично різноманітного матеріалу. **Методи.** Колосся  $F_1$  і  $F_2$  гібридів чотирьох комбінацій схрещування піддавали попередній обробці згідно з удосконаленим способом (4°C, 28 діб), вилучені пиляки культивували на живильних середовищах, які містили замість агар-агару хімічно модифіковані крохмалі Д5а-М та Д5а-1. У контролі зрізані пагони зберігали у воді впродовж п'яти діб з подальшим культивування пиляків на живильному середовищі, загущеному агар-агаром. **Результати.** Підтверджено позитивний вплив удосконаленого способу попередньої обробки колосся та культивування пиляків на середовищах із крохмалю. За використання у складі індукційного живильного середовища нового препарату Д5а-1 було досягнуто майже триразове зростання частоти регенерації зелених рослин. **Висновки.** Для збільшення виходу андрогенних гаплоїдів ярого ячменю доцільним є поєднання в одному технологічному процесі довготривалої попередньої обробки колосся та культивування пиляків на живильних середовищах, що містять замість агар-агару хімічно модифіковані крохмалі.

**Ключові слова:** *Hordeum vulgare* L., культура пиляків *in vitro*, гібриди, попередня обробка, крохмаль, агар-агар, ембріодогенез, регенерація.

Методи експериментальної гаплоїдії, до яких належить культура пиляків *in vitro*, використовують із середини 70-х років минулого століття для швидкого створення гомозиготного

матеріалу в генетичних дослідженнях і селекції [1–4]. Найбільшого прогресу як у теоретичному, так і прикладному аспектах досягнуто у ячменю [5, 6]. Оскільки кожний другий сорт, який вирощується в Європі, є похідним подвоєного гаплоїда [7], питання щодо конкурентоспроможності ліній андрогенного походження у порівнянні з матеріалом, створеним традиційним шляхом, а також щодо ефективності гаплоїдної селекції наразі вже не стоїть. Але актуальними залишаються проблеми генотипної залежності гаплопродукційного процесу і низьких показників виходу рослин-регенерантів у багатьох цінних сортів, ліній і гібридів. Складною для вирішення і досі є проблема альбінізму регенерантів [8, 9]. Окрім цього, перешкодою на шляху широкого впровадження методів експериментального андрогенезу у практичну селекцію є висока вартість компонентів живильних середовищ, що спонукає до пошуку заміників певних реактивів, які б за меншої вартості одночасно сприяли підвищенню ефективності процесів індукції андрогенних структур і регенерації рослин, а отже, більш раціональному використанню матеріальних та енергетичних ресурсів.

У численних літературних наукових джерелах з експериментального андрогенезу *in vitro* відзначається, що найбільш швидким способом масового отримання гаплоїдів є стимулювання прямого ембріодогенезу або розвитку ембріодів з ембріогенного калюсу, що дозволяє за рахунок високого регенераційного потенціалу цих структур значно підвищити результативність гаплопродукційного процесу [7, 10].

Нами вперше встановлено позитивний вплив на ембріодогенез у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі [11] та природні

кукурудзяні крохмалі з підвищеним вмістом амілози, отримані із зерна ліній-носіїв рецесивних мутацій *ae* і *su<sub>2</sub>* [12], а також зернових крохмалів гороху високоамілозного і нормального типів [13]. Розроблено спосіб попередньої обробки колосся за низької плюсової температури, який дозволяє ефективно використовувати холодильне обладнання для зберігання великих обсягів рослинного матеріалу [14].

З огляду на це метою досліджень було оцінювання інноваційних методичних підходів, розроблених на модельних генотипах, на придатність для підвищення частоти індукції морфогенних структур і рослин-регенерантів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* за використання для гаплоїдизації генетично різноманітного матеріалу.

### Матеріали і методи

Як матеріал для досліджень було використано  $F_1$ – $F_2$  гібриди ярого ячменю чотирьох комбінацій схрещування, отриманих за участі сортів і ліній із контрастною здатністю до утворення андрогенних структур (калюсу, ембріодів) та регенерації рослин. Еталоном високої андрогенної здатності слугувала лінія ДГ00-126.

Рослини вирощували в польових умовах. Сівбу було проведено на початку третьої декади квітня. Гідротермічний режим 2018 року впродовж фаз кущення, вихід у трубку та колосіння був вкрай несприятливим через відсутність достатньої кількості опадів і високу температуру повітря, тому було застосовано штучний полив.

Колосся добирали у момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку. Попередню обробку колосся у контролі проводили шляхом витримування пагонів у воді за температури 4 °C у холодильнику впродовж 5–6 діб. Дослідні варіанти передбачали обробку за цієї ж температури ізольованого колосся впродовж 28 діб у чашках Петрі [14] (рис. 1).

Стерилізацію рослинного матеріалу здійснювали, обробляючи колосся у листовій піхві 70 %-им етиловим спиртом упродовж 10–15 хв. Як базове та контроль в експериментах з оптимізації складу штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMSмод. 2 [11]. Для загущення живильних середовищ у дослідних варіантах було використа-

но препарати хімічно модифікованого крохмалю Д5а-М та Д5а-1 (12,0 %), створені у Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ.

Калюси та ембріодиди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS [11]. Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків, зелених і хлорофілдефектних рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків.

Істотність різниці між варіантами досліджу визначали за допомогою дисперсійного аналізу альтернативних ознак та t-критерію [15] з використанням пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

### Результати та обговорення

Результати досліджень (табл. 1) свідчать про істотний вплив на частоти утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів як гібридної комбінації, так і технології гаплоїдної індукції.



а



б

Рис. 1. Попередня обробка рослинного матеріалу ярого ячменю для отримання культури пиляків *in vitro*: пагони у воді (а); колосся без прямого контакту з водою (б).

Таблиця 1. Результативність отримання морфогенних структур і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю залежно від генотипу, способу попередньої обробки за температури 4°C та гелеутворювального компонента живильного середовища

Спосіб попередньої обробки, гелеутворювач	Висаджено пиляків, шт.	О т р и м а н о					
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
ДГ00-126 (еталон)							
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	344	133	38,66	94	27,32	54	15,69
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	404	162	40,09	159	39,25	199	49,25
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	334	212	63,47	209	62,57	286	85,63
НР <sub>05</sub>	–	–	6,95	–	6,83	–	6,16
F <sub>2</sub> Всесвіт × GSHO <i>wx</i>							
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	179	52	29,05	10	5,89	20	11,17
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	125	36	28,80	19	15,20	53	42,40
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	185	106	57,29	43	23,24	108	58,38
НР <sub>05</sub>	–	–	10,22	–	7,54	–	9,51
F <sub>2</sub> GSHO <i>wx</i> × Вакула							
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	192	30	15,62	5	2,60	20	10,42
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	454	77	16,96	21	4,62	74	16,29
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	471	140	29,72	47	9,97	183	38,85
НР <sub>05</sub>	–	–	5,90	–	3,53	–	5,96
F <sub>1</sub> ДГ00-126 × Alamo							
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	293	149	50,85	17	5,80	54	18,43
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	211	34	16,11	19	9,00	103	48,81
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	212	88	41,50	33	15,56	145	68,40
НР <sub>05</sub>	–	–	8,32	–	5,26	–	8,02
F <sub>1</sub> Mebere × ДГ14-189							
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	233	60	25,75	12	5,15	18	8,49
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	195	29	14,87	17	8,71	64	32,82
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	161	49	30,43	21	13,04	75	46,53
НР <sub>05</sub>	–	–	8,31	–	5,49	–	7,94

Найвищі гаплопродукційні показники було помічено в еталонного генотипу – лінії андрогенного походження ДГ00-126 з генетично детермінованою високою культурабельністю. Але й у деяких гібридів також було отримано досить високу ефективність індукції морфогенних структур і регенерації рослин в окремих варіантах досліджу. Зокрема, було підтверджено встановлений раніше позитивний ефект заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі саме на підвищення частоти регенерації рослин за рахунок стимулювання ембріодогенезу та більш високу здатність до індукування андрогенезу *in vitro* нового препарату хімічно модифікованого крохмалю Д5а-1 порівняно з Д5а-М (рис. 2).

Так, використання нового препарату Д5а-1 дозволило підвищити частоту морфогенних пиляків у лінії ДГ00-126 та у двох гібридних популяцій (майже вдвічі), в той час як на середовищі, загущеному крохмалем Д5а-М, цей показник був нижчим, ніж у контролі або істотно не відрізнявся.

Слід зазначити, що на ефективність морфогенетичних процесів впливала, окрім застосованих елементів технології, і якість рослинного матеріалу, використаного для вилучення пиляків, пов'язана з його посухостійкістю, і, мож-

ливо, генотипні особливості чутливості до дії довготривалого холодого та осмотичного стресу. Саме ці чинники, вірогідно, були причиною різкого зменшення кількості морфогенних пиляків у гібрида F<sub>1</sub> ДГ00-126×Alamo на середовищі з крохмалем Д5а-М і меншою мірою на середовищі з крохмалем Д5а-1 порівняно з контролем. А високий відсоток морфогенних пиляків у цій гібридній комбінації в контрольному варіанті (50,85 %) у підсумку призвів до відсутності істотних відмінностей за цим показником між контролем і варіантом з крохмалем Д5а-1 у середньому за дослідом (табл. 2).

Звертає на себе увагу досить високий показник частоти регенерації рослин-альбіносів, отриманих на середовищах, які містили хімічно модифіковані крохмалі, що також є свідченням позитивного ефекту цих гелеутворювачів на ембріодогенез і регенерацію рослин. Водночас отримані дані підтверджують складність проблеми альбінізму рослин-регенерантів у видів родини Poaceae і малу вірогідність її вирішення за рахунок зміни компонентного складу живильного середовища через спряженість явища альбінізму у культурі пиляків *in vitro* з особливостями формування у них чоловічого гаметофіту [16].

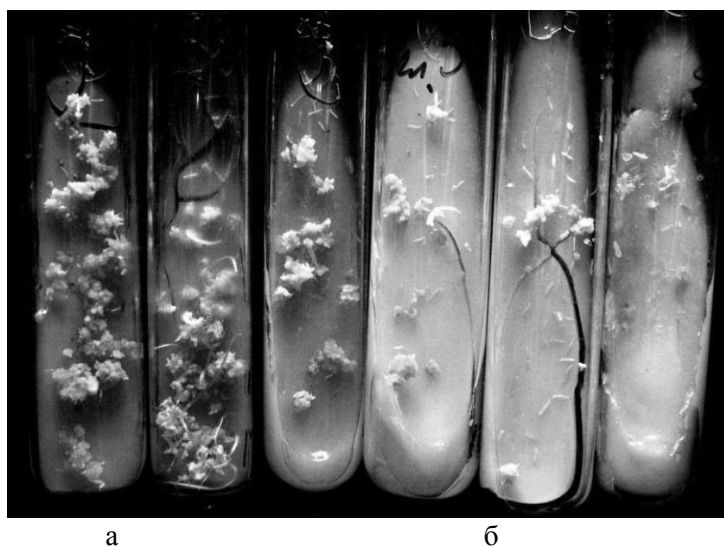


Рис. 2. Утворення морфогенних структур у культурі пиляків *in vitro* F<sub>2</sub> гібриду Всесвіт × GSHO, інокульованих після попередньої обробки колосся за температури 4°C упродовж 28 діб на живильні середовища, які містили хімічно модифіковані крохмалі Д5а-1 (а) і Д5а-М (б) у концентрації 12,0 %.

Таблиця 2. Середня ефективність андрогенезу *in vitro* у гібридів ярого ячменю чотирьох комбінацій схрещування залежно від способу попередньої обробки за температури 4°C та гелеутворювального компонента живильного середовища

Спосіб попередньої обробки, гелеутворювач	Висаджено пиляків, шт.	Отримано					
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Пагони, вода, 5 діб, агар-агар (контроль)	897	291	32,44±1,56	44	4,90±0,72	112	12,49±1,10
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-М	985	176	17,86±1,22*	76	7,72±0,85*	294	29,85±1,46*
Колосся, 28 діб крохмаль Д5а-1	1029	383	37,22±1,51	144	13,99±1,08**	511	49,65±1,56**

Примітки: \* – різниця істотна за  $P \leq 0,05$ ; \*\* – різниця істотна за  $P \leq 0,01$ .

### Висновки

Поєднання в одному технологічному процесі удосконаленого способу довготривалої попередньої обробки ізольованого колосся і культивування пиляків на живильних середовищах, які містили замість агар-агару хімічно модифіковані крохмалі, сприяло підвищенню

ефективності отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю. Виділено новий препарат хімічно модифікованого крохмалю Д5а-1, який мав поліпшені гелеутворюючі характеристики і чинив позитивний вплив на морфогенез у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю.

### References

- Foroughi-Wehr B., Mix G. *In vitro* response of *Hordeum vulgare* anther culture from plants grown under different environments. *Inviron. and Exp. Bot.* 1979. Vol. 19. P. 303–309. doi: 10.1016/0098-8472(79)90033-9.
- Prakash J, Giles K. Induction and growth of androgenic haploids. *International review of cytology.* 1987. Vol. 107. P. 273–292.
- Asif M. Application and use of haploids. In: Asif M, editor. Progress and opportunities of doubled haploid production. (Switzerland): Springer International Publishing, 2013. P. 55–70.
- Thomas W.T.B., Forster B.P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding. In: Doubled haploid production in crop plants / Ed. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. P. 337–349.
- 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. Vol. 120. P. 319–385. doi: 10.1023/A:101756410.
- Devaux P., Kasha K. J. Overview of barley doubled haploid production. In: Advances in haploid production in high plants / Ed. Touraev A., Forster B.P., Mohan S.J. Springer Science+Business Media, 2009. P. 47–64.
- Germana M.A. Somatic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rept.* 2011. Vol. 30. P. 839–857. doi: 10.1007/s00299-011-1061-7.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal.* 2010. Vol. 8, No. 4. P. 377–424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- El Goumi Y., Fakiri M., Benbachir M. et al. Effect of Cold Pretreatment, Anthers Orientation, Spikelet Position and Donor Tiller on the Callusing Response in Barley Anther *In vitro* Culture. *International Journal of Medical Biotechnology and Genetics.* 2017. S2 (003). P. 3–38. doi: 10.19070 /2379-1020-SI02003.
- Maraschin S.F., De Periester W., Spaink H.P., Wang M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male genotype perspective. *Journal of Experimental botany.* 2005. Vol. 56. P. 1711–1726. doi: 10.1093/jxb/eri190.
- Belinskaya E.V., Dulnyev P.G. Modified starch DKKmod as a component of nutrient medium for barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Fiziol. Biokhim. Kult. Rast.* 2007. Vol. 39, No. 2. P. 136–143. [in Russian] / Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал ДККмод 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.
- Bilynska O.V. Application of corn starches with high amylose content (mutations *ae i su2*) in nutrient medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Visnik Kharkivsk'ogo nacional'nogo universitetu im. V.N. Karazina. Seriya: biologiya.* 2010. Vip. 11 (No. 905). S. 60–65. [in Ukrainian] / Білинська О.В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae i su2*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*. *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія.* 2010. Вип. 11 (№ 905). С. 60–65.
- Bilynska O.V., Tymchuk S.M., Derebizova O.Yu. Artificial nutrient medium for barley haploid production in anther culture *in vitro*: Patent for invention 103426 Ukraine. No. a201210359; applied on 03.09.2012., published 10.10.2013, bulletin No. 19.

14. Bilynska O.V. Method of plant material pretreatment for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*: Patent for invention 113261 Ukraine. No. a 2016 00611; applied on 21.05.2016., published 26.12.2016, bulletin No. 14.
15. Plokhinskii N.A. Biometriia. M.: Izd. Moskovskogo universiteta, 1964. 367 s. [in Russian] / Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд. Московского университета, 1964. 367 с.
16. Sunderland N., Huang B. Barley anther culture: the switch of programme and albinism. *Hereditas*. 1985. Supl. 3. P. 27–40.

**BILINSKA O. V.<sup>1</sup>, DULNYEV P. G.<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup> *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*

#### **EFFICIENCY OF SPRING BARLEY HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*: COMPARISON OF BASIC AND IMPROVED TECHNOLOGIES**

**Aim.** Evaluation of innovative methodological approaches elaborated on model genotypes for usability to increase frequencies of morphogenic structure induction and plant regeneration in anther culture *in vitro* in spring barley diverse material. **Methods.** Spikes isolated from  $F_1$  and  $F_2$  hybrids of four crosses were pretreated using an improved method (4°C, 28 days), and anthers were inoculated onto nutrient media containing chemically modified starches D5-M and D5a-1 instead of agar. In control cut tillers were emerged in water and pretreated at 4°C for 5 days. Anthers were cultivated on agar solidified medium. **Results.** Positive effects of the improved method of cold pretreatment and cultivation of anthers on media solidified with starches were confirmed. The advantage of new gelling agent D5a-1 was proved. Particularly, its usage resulted in a three-fold increase in the frequency of green plant regeneration. **Conclusions.** In order to increase spring barley androgenic haploid yield, combination of prolonged cold pretreatment with anther cultivation on media solidified with chemically modified starches instead of agar in an integrated technological process is reasonable.

**Keywords:** *Hordeum vulgare* L., anther culture *in vitro*, cold pretreatment, starch, agar, embryo formation, plant regeneration.