

БІЛИНСЬКА О. В.*Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України,**Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, bilynskaov@gmail.com, (068) 566-03-20***ЗЕРНОВИЙ КРОХМАЛЬ ЯЧМЕНЮ ЯК ГЕЛЕУТВОРЮВАЧ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ
ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ПИЛЯКІВ ТА ІЗОЛЬОВАНИХ ЗАРОДКІВ *HORDEUM VULGARE* L.**

Мета. Визначення можливості заміни агар-агару у середовищі для отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю зерновим крохмалем ячменю нормального та ваху типів. **Методи.** Пиляки лінії ДГ00-126 культивували на живильних середовищах, які містили солі макро- та мікроелементів відповідно за прописами N6 та MS, фізіологічно активні речовини, мальтозу (9,0 %) та різнилися гелеутворювальними компонентами, представленими агар-агаром, зерновим крохмалем ячменю та хімічно модифікованим крохмалем Д5а-1. Трофічні властивості ячмінного крохмалю визначали у культурі пиляків та ізольованих зародків ячменю. **Результати.** Встановлено, що крохмаль типу ваху є непридатним для загущення живильного середовища. Використання ячмінного крохмалю нормального типу (6,5 %) замість агар-агару призвело до істотного зниження частоти регенерації зелених рослин, не вплинуло на кількість морфогенних пиляків. Ячмінний крохмаль поступився крохмалю гороху за здатністю підтримувати ріст проростків у ембріокультурі. **Висновки.** Крохмаль ячменю нормального типу має гірші трофічні властивості порівняно з крохмалем гороху в культурі ізольованих зародків та є менш придатним гелеутворювачем середовища для отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю, ніж агар-агар і хімічно модифікований крохмаль Д5а-1.

Ключові слова: *Hordeum vulgare* L., культура пиляків *in vitro*, ячмінний крохмаль, агар-агар, регенерація.

Гелеутворювачі живильного середовища, яким, на відміну від агар-агару, притаманні трофічні властивості (наприклад, крохмалі), характеризуються специфічним морфогенетичним ефектом у культурі *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів [1, 2]. Першу спробу замінити інертний у фізіологічному відношенні агар-агар на крохмаль було здійснено фінськими дослідниками наприкінці 80-х років. Зокре-

ма, було встановлено, що використання зернового крохмалю ячменю у складі середовища для клонального мікророзмноження картоплі у культурі бульбових дисків сприяло підвищенню частоти регенерації рослин [1]. Сферу застосування цього загусника також було поширено на культуру пиляків *in vitro* ячменю, де було отримано підтвердження позитивного впливу на процеси утворення ембріодів та нормально пігментованих рослин-регенерантів [3]. Особливо вдалим для реалізації морфогенного потенціалу культури пиляків ячменю виявилось поєднання ячмінного крохмалю з мальтозою як трофічним вуглеводним компонентом живильного середовища [4, 5]. А отримання високих гаплопродукційних показників за використання у середовищі, загущеному ячмінним крохмалем, інертного у фізіологічному відношенні дисахариду мелібіози засвідчило значну роль трофічних властивостей крохмалю в індукуванні андрогенного розвитку мікроспор [6]. Окрім цього, з'явилося повідомлення щодо стимулюючого впливу на морфогенез у культурі пиляків *in vitro* крохмалю, походження якого відповідало видовій приналежності експлантів, тобто для культивування пиляків ячменю кращим гелеутворювачем виявився саме зерновий крохмаль ячменю порівняно з крохмалями кукурудзи, картоплі, рису та пшениці [7].

Водночас було встановлено, що щільність гелю, утвореного зерновим крохмалем ячменю у концентраціях 6,0–9,0 %, у процесі культивування зменшується, що потребує застосування нейлонової сіточки для утримання пиляків на поверхні живильного середовища [3–7]. Останній факт спонукав нас до дослідження як можливих гелеутворювачів крохмалів іншого походження, зокрема зернових крохмалів, мутантних за генами структури ендосперму ліній кукурудзи та гороху, а також хімічно модифікованих крохмалів, серед яких було виділено препарати, придатні для використання у біотехнології рослин [8–10]. Але створення в IP ім. В. Я. Юр'єва

© БІЛИНСЬКА О. В.

зразків ячменю з різним співвідношенням амілози та амілопектину сприяло поновленню інтересу до ячмінного крохмалю як компонента живильного середовища.

Мета досліджень полягала у вивченні можливості заміни агар-агару у середовищі для отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю зерновим крохмалем ячменю нормального та ваху типів та оцінюванні їх трофічних властивостей.

Матеріали і методи

Модельним генотипом слугувала лінія ярого ячменю андрогенного походження ДГ00-126 з високою здатністю до продукування гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro*. Для отримання культури ізольованих зародків використано сорт ярого ячменю Вакула.

Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах. Сівбу було проведено у другу декаду березня. Гідротермічний режим третьої декади березня, другої та третьої декад квітня сприяв отриманню дружніх сходів і кущенню. Впродовж фази вихід у трубку спостерігалася помірно тепла погода з опадами, що сприяло отриманню рослинного матеріалу високої якості.

Колосся добирали у момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку. Попередню обробку колосся проводили шляхом витримання пагонів у воді за температури 4 °C у холодильнику впродовж 5–6 діб.

Для отримання асептичної культури пиляків колосся у листовій піхві обробляли 70 %-м етиловим спиртом упродовж 10–15 хв. Зернівки у фазі молочно-воскової стиглості перед вилученням зародків стерилізували за розробленим нами методом [11].

Як базове та контроль в експериментах з оптимізації складу штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMSмод. 2 [8], яке містило як гелеутворювач агар-агар (0,8 %). У дослідних варіантах використано як гелеутворювачі зернові крохмалі ячменю нормального типу (6,5 %) та ваху, а також хімічно модифікований крохмаль Д5а-1 (12,0 %), відібраний за результатами раніше проведених досліджень. Ячмінний крохмаль (нормального типу та ваху) і крохмаль гороху було отримано за загальноприйнятою методикою [12]. Препарати хімічно модифікованого крохмалю було надано П. Г. Дульневим (Инсти-

тут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України).

Калюси та ембріоди для отримання андрогенних рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS [8]. Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків.

Для визначення амілазної активності було застосовано йодну реакцію крохмалю [13]. Гелі, утворені крохмалю, обробляли 0,025 % розчином йоду до і після культивування пиляків і морфогенних структур на індукційному живильному середовищі. Дослідження трофічних властивостей крохмалю ячменю здійснювали у порівнянні з агар-агаром та крохмалем гороху нормального типу. Ізольовані зародки розміром 3–4 мм, вміщували на середовища, які містили згадані гелеутворювачі в оптимальних концентраціях (три варіанти середовища, по 15–20 шт. зародків на кожний варіант). Середовища не містили солей макро- та мікроелементів і сахарози. Значущість різниці між дослідними варіантами оцінювали за HP_{05} , яку отримували за допомогою дисперсійного аналізу якісних ознак за використання програми «Microsoft Office Excel 2010».

Результати та обговорення

Результати досліджень гелеутворювальних властивостей зернового крохмалю ячменю засвідчили, що концентрація 9,0 % є зовнішньою для отримання клейстеру, придатного для перенесення без істотних втрат до культуральних посудин як для крохмалю нормального типу, так і для ваху. Оптимальною виявилася концентрація 6,5 %. Гель, утворений із крохмалю нормального типу, мав достатню для вміщення на його поверхню пиляків щільність і гарантовано впродовж 30 діб зберігав свої структурно-механічні властивості (рис. 1). Натомість крохмаль типу ваху виявився непридатним для загущення живильного середовища, оскільки утворений ним гель не зберігав свою структуру навіть за концентрації 9,0 %.

Результати досліджень із культивування пиляків *in vitro* засвідчили (табл.), що заміна агар-агару на ячмінний крохмаль призвела до істотного зниження частоти регенерації зелених рослин, не вплинувши на кількість морфогенних пиляків.

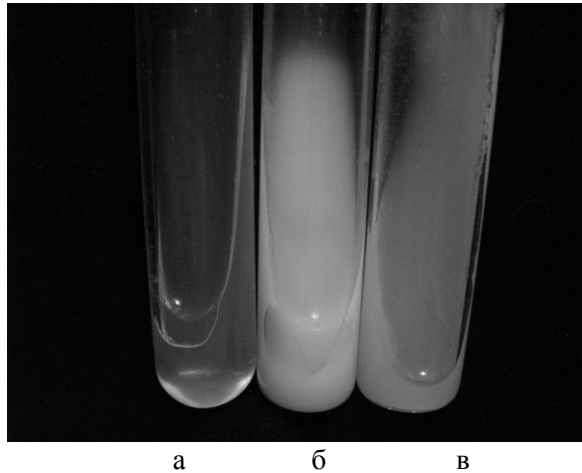


Рис. 1. Живильні середовища, які різнилися гелеутворювачем, через 40 діб після приготування (температура зберігання – 18–20 °С): а) агар-агар – 0,8 %; б) крохмаль Д5а-1 – 12,0 %; в) зерновий крохмаль ячменю – 6,5 %.

Таблиця. Андро́генез *in vitro* у лінії ярого ячменю ДГ00-126 на живильних середовищах, загущених агар-агаром, зерновим крохмалем ячменю нормального типу та хімічно модифікованим крохмалем

Гелеутворювач індукційного живильного середовища, вміст	Висадже-но пиляків, шт.	Отримано			
		морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
		шт.	%	шт.	%
Агар-агар, 0,8 %	504	242	48,01	190	37,69
Ячмінний крохмаль, 6,5 %	609	301	49,42	164	26,92
Хімічно моди-фікований крохмаль Д5а-1, 12,0 %	338	189	55,91	216	63,90
НІР ₀₅	–	–	6,30	–	5,89

Спостереження за індукцією морфогенних структур показали (рис. 2), що на середовищі з ячмінним крохмалем вони були подібними до утворених на агаровому середовищі, тобто характеризувалися переважанням неморфогенного калюсу, особливо за збільшення тривалості культивування на індукційному середовищі.

На обох середовищах спостерігалось утворення рослин-регенерантів, яке тривало і після пересадки морфогенних структур на агарове середовище. Але варто зазначити, що цей показник був майже вдвічі вищим від використання у складі індукційного середовища хімічно модифікованого крохмалю Д5а-1 з подальшою пересадкою ембріодів, глобулярних структур та морфогенного калюсу на агарове регенераційне середовище.

Для пояснення такого неочікуваного негативного результату нами було проведено вивчення трофічних властивостей зернового кро-

хмалю ячменю у культурі пиляків та культурі ізолюваних зародків ячменю.

Як відомо, єдиною реакцією, яка лежить в основі якісного та кількісного визначення крохмалю, його сополімерів і продуктів ферментативного та термічного гідролізу, є забарвлення розчинами йоду [13]. За результатами фарбування слабким розчином йоду живильного середовища, загущеного ячмінним крохмалем нормального типу, нами було отримано прямий доказ наявності амілазної активності тканин пиляків та андрогенних новоутворень. Як видно із рис. 3, живильне середовище до інокуляції пиляків за обробки розчином йоду мало типове синє забарвлення. Індукційне живильне середовище після перенесення утворених морфогенних структур на середовище для регенерації за обробки розчином йоду втратило синє забарвлення, а розчин йоду (змив із поверхні) став пурпуровим через декстрини, що свідчить про

деструкцію крохмалю живильного середовища під дією амілаз, які виділяли згадані вище експланти.

Слід зазначити, що аналогічні дослідження, проведені за використання як гелеутворювача хімічно модифікованого крохмалю Д5а-1, показали, що живильне середовище після перенесення морфогенних структур і фарбування розчином йоду мало колір вихідного гелю, що вказує на утворення низькомолекулярних продуктів ферментативного гідролізу, а отже, і на більшу біодоступність хімічно модифікованого крохмалю порівняно з крохмалем ячменю.

Із метою оцінювання трофічних властивостей зернового крохмалю ячменю було проведено експеримент із культивування ізольованих

зародків сорту ярого ячменю Вакула на середовищах, які різнилися гелеутворювальним компонентом.

Для порівняння було використано зерновий крохмаль гороху нормального типу, який за результатами раніше проведених досліджень за трофічними властивостями перевищив усі досліджені препарати хімічно модифікованих крохмалів, а також крохмаль гороху амілозного типу та високоамілозні крохмалі, отримані із зерна мутантних ліній кукурудзи – носіїв рецесивних алелей *ae* та *su₂* [14].

Результати досліджень показали (рис. 4), що ячмінний крохмаль поступився за здатністю підтримувати ріст проростків у ембріокультурі крохмалю гороху нормального типу.

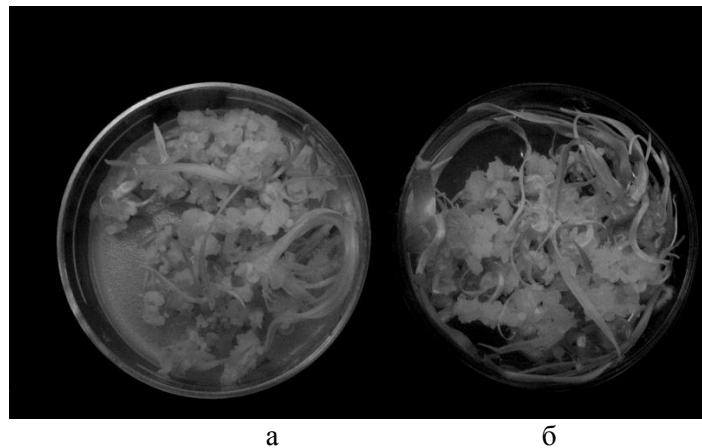


Рис. 2. Індукція морфогенних структур і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 на індукційних середовищах, які різнилися гелеутворювальним компонентом: а) зерновий крохмаль ячменю нормального типу (6,5 %), б) агар-агар (0,8 %).

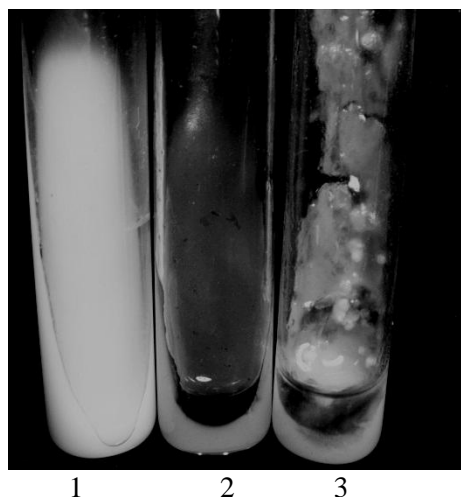


Рис. 3. Йодна реакція живильного середовища, загущеного ячмінним зерновим крохмалем нормального типу (6,5 %), до та після культивування *in vitro* пиляків ярого ячменю та морфогенних структур: 1) гель до інокуляції пиляків; 2) гель, оброблений 0,025 % розчином йоду, до інокуляції пиляків; 3) гель, оброблений 0,025 % розчином йоду, після пересадки морфогенних структур на регенераційне середовище.

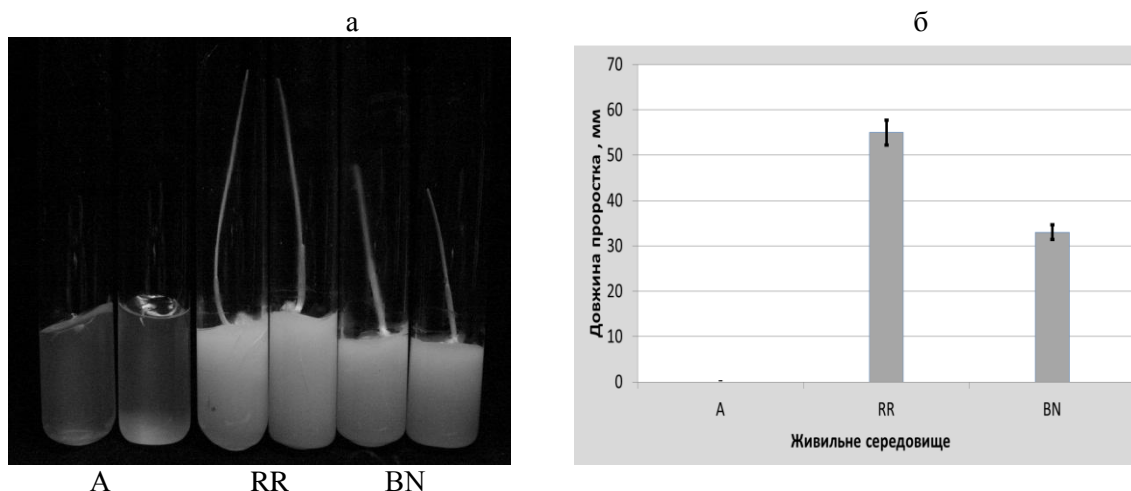


Рис. 4. Проростки сорту ярого ячменю Вакула, отримані у культурі ізолюваних зародків (а), та їх довжина (б) через 14 діб після інокуляції на живильні середовища, які різнилися гелеутворювачем. А – агар-агар (0,8 %); RR – крохмаль гороху нормального типу (4,5 %); BN – зерновий крохмаль ячменю нормального типу (6,5 %).

Отримані результати досліджень із визначення трофічних властивостей зернового крохмалю ячменю в ембріокультурі та культурі пилків *in vitro*, на нашу думку, є цілком прийнятними для пояснення особливостей морфогенезу в обох експериментальних системах. Водночас незрозумілим залишається питання щодо такої дії амілаз із тканин і клітин ячменю на крохмаль, виділений із зерна того ж ячменю. Можливо, це пов'язано не лише із структурою крохмалю, а й з генотиповими особливостями рослинного матеріалу, використаного для отримання експлантів. Тому не виключено, що ембріокультура *in vitro* в разі застосування певних методичних підходів може виявитися придатною для попереднього оцінювання як амілолітичної активності сортів ячменю, так і біологічної цінності крохмалів різного походження.

Висновки

Зернові природні крохмалі ячменю нормального типу та ваху різнилися за гелеутворювальними властивостями. Крохмаль типу ваху є непридатним для використання у складі живильного середовища, оскільки утворений ним гель не зберігав свої структурно-механічні властивості навіть за концентрації 9,0 %. Для зернового крохмалю ячменю нормального типу оптимальною концентрацією є 6,5 %. Крохмаль ячменю нормального типу поступився за трофічними властивостями крохмалю гороху нормального типу у культурі ізолюваних зародків ячменю та виявився менш придатним гелеутворювачем середовища для отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю, ніж агар-агар і хімічно модифікований крохмаль Д5а-1.

References

1. Sorvari S. Differentiation of potato tuber disks in barley starch gelatinized nutrient media. *Ann. Agric. Fenn.* 1986b. Vol. 25. P. 133–138.
2. Bilynska O.V. Effect of nutrient media containing natural and chemically modified starches on haploid production in spring barley anther culture *in vitro*. *Biological Systems, Biodiversity, and Stability of Plant Communities* / Ed. L.I. Weisfeld, A.I. Opalko, N.A. Bome, S.A. Beguzarova. Waretown (USA): Apple Academic Press, 2015. P. 211–228.
3. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture. *Ann. Agr. Fenn.* 1986a. Vol. 25. P. 127–133.
4. 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 Breed.* 1989. Vol. 103, No. 2. P. 110–118. doi.org/10.1111/j.1439-0523.1989.tb00358.x.
5. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production of doubled haploids in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rept.* 1989. Vol., No. 2. P. 110–118. doi.org/10.1007/BF00716843.
6. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media. *Plant Breed.* 1987. Vol. 99, No. 2. P. 161–171. doi.org/10.1111/j.14390523.1987.tb01167.x.
7. Sorvari S. Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley starch and agar gelatinized media. *Ann. Agr. Fenn.* 1986c. Vol. 25. P. 249–254.
8. Belinskaia E.V., Dul'nev P.H. Modifitsirovannyi krakhmal DKKmod kak komponent pitatel'noy sredy dlia polucheniia gaploidov iachmenia v kul'ture pyl'nikov in vitro. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnikh rasteniy.* 2007. T. 39, № 2. S. 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.
9. Bilyns'ka O. V. Zastosuvannia kukurudzianykh krokhmaliv z pidvyshchenym vmistom amilozy (mutatsii *ae* i *su*₂) uskladi shtuchnoho zhyvyl'noho seredovyshcha dlia oderzhannia haploidiv iaroho iachmeniu u kul'turi pyliakiv *in vitro*. *Visnyk Kharkivs'koho natsional'noho universytetu im. V.N. Karazina. Seriya: biolohiia*. 2010. Vyr. 11 (№ 905). S. 60–65. [in Ukrainian] / Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*₂) ускладі 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.
 10. 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.
 11. Bilynska O.V. Method for production of barley immature embryo culture *in vitro*: Patent for invention 118385 Ukraine. No. a2017100177; applied on 04.01.2017, published 10.01.2019, bulletin No. 14.
 12. Rikhter M., Augustat Z., Shirbaum K. Izbrannye metody issledovaniia krakhmala. M.: Pishchevaia promyshlennost', 1975. 183 s. [in Russian] / Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум К. Избранные методы исследования крахмала. М.: Пищевая промышленность, 1975. 183 с.
 13. Prozina M.N. Botanicheskaia mikrotekhnik. M.: Vysshaia shkola, 1960. 205 s. [in Russian] / Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М.: Высшая школа, 1960. 205 с.
 14. Bilyns'ka O.V., Dul'niev P.H. Morfohenetychnyy efekyt i trofichni vlastyvyosti khimichno modyfikovanoho krokhmalii D-5aM u kul'turi *in vitro* pyliakiv ta kul'turi izol'ovanykh zarodkiv iachmeniu iaroho. *Faktyory eksperymental'noi evoliutsii orhanizmv*. Kyiv: Lohos, 2015. T. 17. S. 107–111. [in Ukrainian] / Білінська О.В., Дульнєв П.Г. Морфогенетичний ефект і трофічні властивості хімічно модифікованого крохмалю D-5aM у культурі *in vitro* пиляків та культурі ізольованих зародків ячменю ярого. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2015. Т. 17. С. 107–111.

BILYNSKA O.V.

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

GRAIN BARLEY STARCH AS A GELLING AGENT OF NUTRIENT MEDIA FOR CULTIVATION OF ANTHERS AND ISOLATED EMBRYIOS OF *H. VULGARE* L.

Aim. Determination the possibility of agar replacement with normal and waxy type starches produced from barley seeds in the nutrient media for spring barley haploid production. **Methods.** Anthers of spring barley line DH00-126 were inoculated on inductive media containing N6 macro-, MS micronutrients, organic supplements, maltose (9.0 %) and differed in solidifying agents (agar, starch from barley seeds or chemically modified starch D5a-1). Trophic capacities of barley starch were determined both in anther and embryo culture of barley. **Results.** It was determined that barley starch of waxy type was not suitable for solidifying of nutrient medium. Use of normal type barley starch (6.5 %) resulted in sufficient decrease in the frequency of green plant regeneration. At the same time, this modification had no effect on the number of morphogenic anthers. Barley starch was inferior to pea starch in the ability to support seedling growth in embryo culture *in vitro*. **Conclusions.** Barley starch of normal type has worse trophic capacities in comparison to pea starch in embryo culture. It was appeared barley starch to be a less suitable gelling agent of medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro* than agar and chemically modified starch D5a-1.

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