

УДК: 633.16:575.224.234

**Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози
(мутації *ae* і *su₂*) у складі штучного живильного середовища для
одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*
О.В.Білинська**

Інститут рослинництва імені В.Я.Юр'єва УААН (Харків, Україна)

Досліджено можливість заміни агар-агару у штучному живильному середовищі для культивування пиляків ярого ячменю на крохмалі з підвищеним вмістом амілози, отримані із зерна ліній кукурудзи, які є носіями природних мутацій генів структури ендосперму *ae* і *su₂*. Підтверджено позитивний вплив кукурудзяних крохмалів на процеси ембріодогенезу та регенерації зелених рослин. Розроблено склад середовищ, застосування яких дозволило істотно підвищити частоту ембріогенних пиляків і регенерації зелених рослин у генотипів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*.

Ключові слова: *Hordeum vulgare L.*, *Zea mays L.*, ендоспермальні мутації, культура пиляків *in vitro*, живильні середовища, агар-агар, крохмаль, амілоза.

**Использование кукурузных крахмалов с повышенным содержанием
амилозы (мутации *ae* и *su₂*) в составе питательной среды для получения
гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*
Е.В.Белинская**

Изучена возможность замены агар-агара в искусственной питательной среде для культивирования пыльников ярового ячменя крахмалами с повышенным содержанием амилозы, полученными из зерна линий кукурузы, которые являются носителями естественных мутаций генов структуры эндосперма *ae* и *su₂*. Подтвержден положительный эффект кукурузных крахмалов на процессы эмбриодогенеза и регенерации зеленых растений. Разработан состав сред, использование которых позволило существенно увеличить частоту эмбриогенных пыльников и регенерации зеленых растений у генотипов с контрастной способностью к андрогенезу *in vitro*.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare L.*, *Zea mays L.*, эндоспермальные мутации, культура пыльников *in vitro*, питательные среды, агар-агар, крахмал, амилоза.

**Application of corn starches with high amylose content (mutations *ae* and *su₂*)
in nutrient medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*
O.V.Bilynska**

The possibility of agar substitution in nutrient medium for spring barley anther culture *in vitro* by the starches with a high amylose content obtained from seeds of corn lines, which were the carriers of natural mutations of endosperm structure genes *ae* and *su₂* was investigated. A positive effect of the corn starches on the embryogenesis and green plant regeneration was confirmed. The medium composition promoting an essential increase of the embryogenic anther and plant regeneration rates in genotypes with a contrast capacity for androgenesis *in vitro* was elaborated.

Key words: *Hordeum vulgare L.*, *Zea mays L.*, mutations of endosperm structure, anther culture *in vitro*, nutrient media, agar, starch, amylose.

Вступ

Культура пиляків *in vitro* як один з найбільш ефективних методів експериментальної гаплоїдії успішно застосовується у практичній селекції та генетичних дослідженнях для прискореного отримання гомозиготних ліній (Choo et al., 1985; Jähne-Gärtner, Lörtz, 1995; Сулима и др., 2000; Білинська, 2006). На сьогодні за використання гаплоїдних технологій створено більше 200 сортів, в тому числі 99 сортів ячменю (Thomas et al., 2003; Круглова и др., 2005).

Слід зазначити, що потенційні можливості гаплоїдної селекції можуть бути реалізовані лише за наявності ефективних технологій індукції гаплоїдів, які б забезпечували одержання достатньої їх

кількості від довільної комбінації схрещування або сорту, максимально нівелюючи генотипну залежність експериментального андрогенезу *in vitro*.

Відомо, що це завдання вирішується шляхом удосконалення усіх елементів технології гаплоїдної індукції, серед яких склад штучних живильних середовищ для культивування пиляків і регенерації рослин вважається одним з основних. При цьому оптимізації підлягають як мінеральні, так і органічні компоненти: солі макро- і мікроелементів, фітогормони, вітаміни, вуглеводи з трофічною і гелеутворюючою функцією тощо (Murashige, Skoog, 1962; Manninen, 1998; Білинська, 2009).

У твердих і напівтвердих штучних живильних середовищах для культивування рослинних клітин, тканин та органів в якості речовин, які утворюють гель, необхідний для підтримання об'єкту на поверхні середовища, використовують агар-агар, рідше агарозу (Kohlenbach, Wernike, 1978), фітагель (Gonzães et al., 1997), гельрит (Halberg et al., 1990), а також крохмалі як природного походження (Sorvari, 1986; Kuhlmann, Foroughi-Wehr, 1989), так і піддані хімічній модифікації (Дульнев та ін., 2002).

Нами вперше експериментально обгрунтовано доцільність використання як гелеутворювачів хімічно модифікованих крохмалів ДККмод і Д-2 у живильних середовищах для індукції андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю (Белинская, Дульнев, 2007; Білинська, Дульнев, 2008). Вперше встановлено стимулюючий вплив на морфогенез у цій експериментальній системі заміни агар-агару кукурудзяними крохмалюми із зерна природних мутантів *ae* (Білинська та ін., 2008) і *su₂* (Білинська та ін., 2009), у яких вміст нерозгалуженого сополімеру амілози становить відповідно 50–80 і 35–40 %, на відміну від крохмалю нормального типу, у якого вміст амілози не перевищує 25–27 % (Сое, Поласко, 1994).

Метою досліджень було вивчення ефективності заміни агар-агару крохмалюми амілозного типу у складі штучного живильного середовища для культивування *in vitro* генотипів ярого ячменю з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro* і визначення можливості підвищення гаплопродукційних показників, насамперед, у генотипу з низькою частотою індукції новоутворень і регенерації рослин.

Об'єкти і методи досліджень

Рослинний матеріал для досліджень було представлено сортами ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L.) селекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Ор'єва Екзотик і Фенікс та лінією ДГ00-126, створеною на основі гібриду F₁ сортів Екзотик і Харківський 74 методом культури пиляків *in vitro* (Белинская, 2008). Залучені до експерименту генотипи різнилися за здатністю до андрогенезу *in vitro*, яка була визначена на основі аналізу результатів багаторічних досліджень (Білинська, 2008). Зокрема, сорт Фенікс характеризувався низькою частотою утворення андрогенних структур і зелених рослин-регенерантів. Сорту Екзотик притаманні низький вихід рослин на тлі високої частоти калюсогенезу, а лінії ДГ00-126 – високий рівень усіх показників гаплопродукції і переважання серед регенерантів нормально пігментованих рослин.

Рослини-донори пиляків вирощували на дослідній ділянці (посів – ручною саджалкою, відстань між рядками – 15, між рослинами – 5 см). Експеримент проведено у 2008 р., метеорологічні умови якого були сприятливими для росту і розвитку ячменю впродовж усього вегетаційного періоду.

Колосся добиралося в момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фази розвитку (III декада травня і I декада червня). Цитологічний аналіз із визначення фази розвитку мікроспор проводили за допомогою мікроскопу МБ1-11 на тимчасових препаратах пиляків, забарвлених 2% розчином карміну у 45% оцтовій кислоті.

Попередню обробку колосся проводили, вміщуючи пагони у воду. Тривалість експозиції: 5–6 діб при температурі +4°C у холодильнику.

Як контроль у експериментах з оптимізації складу штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro* було використане розроблене нами середовище NMSмод.2, яке містило макроелементи середовища N6 (Chu, 1978), мікроелементи середовища MS (Murashige, Skoog, 1962) і такі компоненти в мг/л: 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) – 2; БАП (бензиламінопурин) – 0,5; вітамін В₁ – 1; В₆ і РР – по 0,5; гліцин – 2; аланін і пролін – 100; глутамін – 200; лактальбумін – 300; міо-інозитол – 100; а також мальтозу – 90 г/л; картопляний екстракт – 20%; агар-агар – 0,76% („Difco”, США).

В дослідних варіантах індукційного середовища агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль Д₂, одержаний у Науково-інженерному центрі «АКСО» Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії НАНУ (Дульнев та ін., 2002), а також на кукурудзяні крохмалі з підвищеним вмістом амілози (мутації *su₂* і *ae*), отримані відповідно з зерна ліній АС-11 і АЕ-392 за загальноприйнятою методикою (Рихтер і др., 1975) з деякими модифікаціями, надані С.М.Тимчуком і О.Ю.Деребізовою.

До складу індукційного середовища крохмалі вводили у концентраціях, які було визначено як оптимальні за результатами досліджень гелеутворюючих властивостей. Зокрема, для хімічно модифікованого крохмалю Д₂ ця концентрація становила 12,0% (Білінська, Дульнев, 2008); для крохмалів із зерна мутантних форм кукурудзи – 6,5% (Білінська та ін., 2008, 2009).

Новоутворення – калюс і ембріоїди – пересаджували на регенераційне живильне середовище Р: мінеральна основа MS, вітаміни В₁, В₆ і РР – по 0,5 мг/л; глутамін, міо-інозитол – по 100 мг/л; сахароза – 30 г/л; агар-агар – 0,8%.

Результативність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю ембріогенних пиляків, тобто пиляків, на поверхні яких утворилися ембріоїди чи ембріогенний калюс, та кількістю зелених і хлорофілдефектних рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків. Одержані дані оброблено за допомогою дисперсійного аналізу (Плохинский, 1964).

Результати та обговорення

У таблиці наведено результати експерименту з індукування андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* трьох генотипів ярого ячменю на штучних живильних середовищах, які різнилися за гелеутворюючим компонентом.

Таблиця.

Здатність до андрогенезу *in vitro* у ярого ячменю в залежності від генотипу та гелеутворюючого компоненту штучного живильного середовища (2008 р.)

Генотип, середовище	Висаджено пиляків, шт.	О д е р ж а н о					
		ембріогенних пиляків		зелених рослин- регенерантів		рослин- альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
ДГ00-126							
NMSмод.2 (контроль)	352	147	41,76	90	25,57	101	28,69
NMSД ₂ ¹	345	96	27,82	108	31,30	40	11,59
NMSae ²	504	242	48,02	179	35,51	51	10,12
NMSsu ₂ ³	350	224	64,00	187	53,42	140	40,00
HCP ₀₅			6,81		6,64		5,52
Екзотик							
NMSмод.2 (контроль)	407	194	47,65	30	7,37	85	20,88
NMSД ₂ ¹	418	114	27,27	38	9,18	123	29,42
NMSae ²	412	230	55,82	44	10,67	76	18,44
NMSsu ₂ ³	370	238	64,32	65	17,57	106	28,64
HCP ₀₅			6,66		4,31		5,90
Фенікс							
NMSмод.2 (контроль)	357	25	7,00	2	0,56	30	8,40
NMSД ₂ ¹	406	26	6,40	18	4,43	29	7,14
NMSae ²	379	82	21,64	22	5,80	28	7,39
NMSsu ₂ ³	329	115	34,95	52	15,81	58	17,63
HCP ₀₅			5,16		3,46		4,27
Середнє⁴							
NMS М ₂ (контроль)	1116	366	32,80	122	10,93	216	19,36
NMSД ₂ ¹	1169	236	20,19	164	14,03	192	16,42
NMSae ²	1295	554	42,78	245	18,19	155	11,97
NMSsu ₂ ³	1049	577	55,00	304	28,98	304	28,98
HCP ₀₅			3,81		3,09		3,14

Примітка: контроль – агар-агар (0,76%, „Difco”); ¹ – хімічно модифікований крохмаль Д₂ (12,0%); ² – кукурудзяний крохмаль *ae* (6,5%); ³ – кукурудзяний крохмаль *su*₂ (6,5%); ⁴ – середнє значення для трьох генотипів.

Аналіз гаплопродукційних показників свідчить про наявність генотипних відмінностей за чутливістю до культивування *in vitro* і специфічного морфогенетичного ефекту досліджуваних речовин. Так, незалежно від варіанту досліду мало місце збереження рангів генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro*, що відповідало багаторічним даним. Зокрема, у лінії ДГ00-126 було отримано найвищі частоти регенерації нормально пігментованих рослин, а сорт Фенікс значно поступився цьому генотипу. У сорту Екзотик вдалося індукувати спорофітний розвиток мікроспор у значній кількості пиляків, однак, висока частота утворення андрогенних структур не призвела до формування відповідної їй кількості рослин-регенерантів.

Характеризуючи вплив гелеутворюючих компонентів середовища на процеси калюсо-, ембріодогенезу і регенерації рослин, слід відмітити ряд принципових відмінностей між агар-агаром, природними і хімічно модифікованим крохмалем.

Як свідчать результати досліджень, хімічно модифікований крохмаль Д2 пригнічував процес утворення андрогенних структур у обох високочутливих до андрогенезу *in vitro* генотипів, істотно не вплинувши на цей показник у сорту Фенікс. Водночас у останнього генотипу на середовищі з крохмалем Д2 спостерігалось істотне зростання частоти регенерації зелених рослин. У лінії ДГ00-126 виявлено тенденцію до збільшення виходу нормально пігментованих рослин за застосування як гелеутворювача Д2 порівняно з агар-агаром.

Як і в раніше проведених експериментах (Білинська та ін., 2008, 2009), було відмічено переваги використання як заміників агар-агару природних кукурудзяних крохмалів з генетично детермінованим високим вмістом амілози, які на відміну від хімічно модифікованих крохмалів не чинили негативного впливу на процес індукції новоутворень і динаміку їх росту. Зокрема, серед андрогенних структур переважали ембріоди (особливо у лінії ДГ00-126 і сорту Фенікс), які сформувалися шляхом прямого ембріодогенезу або на поверхні ембріогенного калюсу. При цьому мала місце однакова динаміка формування андрогенних структур і рослин-регенерантів на середовищі з агар-агаром і кукурудзяними крохмалю, у тому числі проростання ембріодів на середовищі для індукції новоутворень (рис.).

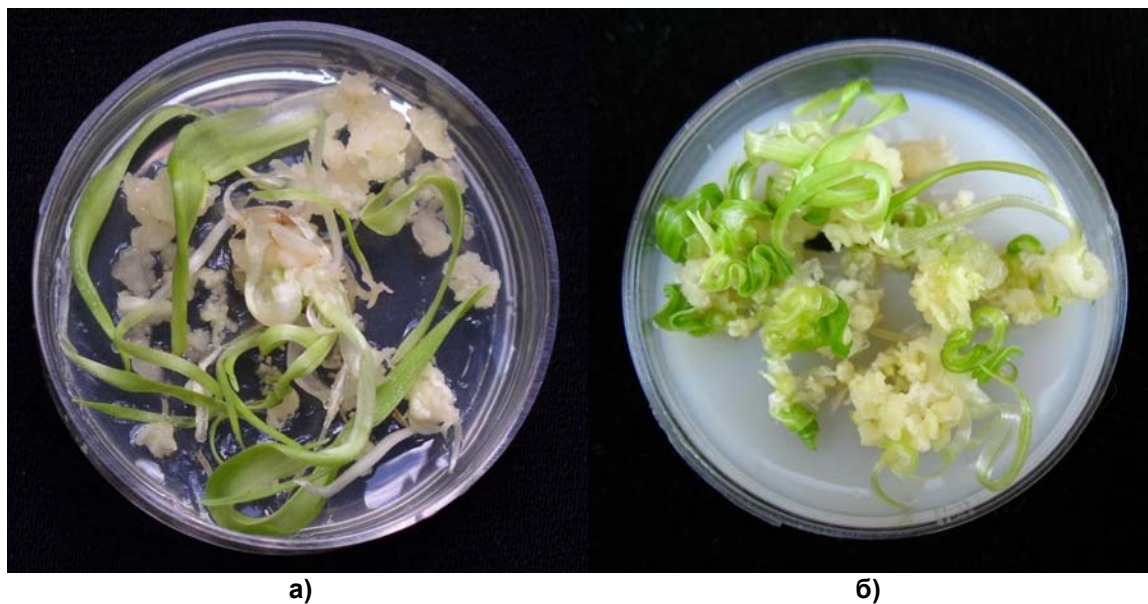


Рис. Індукція новоутворень і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 на середовищі з агар-агаром (а) і кукурудзяним крохмалем su_2 (б)

Слід відзначити, що у всіх залучених до експерименту генотипів частоти ембріогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів були істотно вищими порівняно з контролем (агар-агар) і середовищами, які містили хімічно модифікований крохмаль Д₂, за винятком частоти регенерації зелених рослин у сорту Екзотик на середовищі NMSae.

Найвищі показники гаплопродукції було отримано за використання як компоненту індукційного середовища крохмалю з зерна лінії-носія мутантного гена su_2 . Так, у лінії ДГ00-126 і сорту Екзотик відмічено зростання частоти ембріогенних пиляків на 20% і більш ніж двократне збільшення частоти регенерації зелених рослин порівняно з контролем. На цьому середовищі у лінії ДГ00-126 вихід зелених рослин становив 53,42%. Заміна агар-агару на ае-крохмаль виявилася менш ефективною,

але й на цьому середовищі були отримані показники гаплопродукції, які перевищили такі у контрольному варіанті.

На особливу увагу заслуговують результати, одержані на середовищах з крохмалем у сорту Фенікс, якому притаманна низька здатність до андрогенезу *in vitro*. Зокрема, на середовищі з крохмалем *ae* кількість ембріогенних пиляків зростає у цього генотипу до 21,64%, а на середовищі з крохмалем *su₂* – до 34,95%, в той час як у контролі (середовище з агар-агаром) цей показник був на рівні 7,00%.

Істотне зростання відмічено і щодо частоти регенерації зелених рослин. Зокрема, за рахунок заміни агар-агару на крохмаль *su₂* досягнуто збільшення частоти регенерації зелених рослин з 0,56 до 15,80%, що є найвищим показником для сорту Фенікс за 7 років досліджень, впродовж яких він використовувався як модельний генотип у дослідженнях з удосконалення технології індукції андрогенних гаплоїдів (Білинська, 2008).

В середньому для трьох генотипів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro* частота регенерації зелених рослин на середовищах, які містили кукурудзяні крохмалі, становила 18,19% (мутація *ae*) і 28,98% (мутація *su₂*), що є підставою для прогнозування виходу гаплоїдів на основі гібридного селекційного матеріалу принаймні на рівні 20%.

Слід зазначити, що отримані в експерименті середні показники гаплопродукції на середовищах з крохмалем відповідно у два і три рази для мутацій *ae* і *su₂* перевищили технологічні параметри розробленої нами схеми отримання андрогенних гаплоїдів ярого ячменю (Білинська та ін., 2007). З огляду на те, що вартість природних крохмалів майже у 100 разів менша за вартість високоякісного агар-агару іноземного виробництва, наприклад, „Difco” (США), очевидними є і економічні переваги їх використання в біотехнології рослин.

Таким чином, підтверджено доцільність заміни агар-агару у складі штучних живильних середовищ для культивування пиляків ярого ячменю на кукурудзяні крохмалі, отримані з зерна ліній-носіїв природних мутацій *ae* і *su₂*. За використання як гелеутворювачів цих високоамілозних крохмалів вдалося частково подолати генотипну залежність експериментального андрогенезу *in vitro*, про що свідчить багаторазове зростання показників гаплопродукції у генотипу з низькою здатністю до утворення андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків.

Отримані результати дають підставу рекомендувати *ae*- і *su₂*-крохмалі для застосування у штучних живильних середовищах для індукції гаплоїдів ячменю. Перспективним також є випробування придатності середовищ, які містять крохмаль, для культивування *in vitro* інших рослинних об'єктів.

Список літератури

- Белинская Е.В. Наследование способности к андрогенезу *in vitro* у ярого ячменя // Цитология и генетика. – 2008. – Т.41, №4. – С. 27–37.
- 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.
- Білинська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2006. – №100. – С. 13–19.
- Білинська О.В. Прояв генотипних особливостей експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю в залежності від елементів технології гаплоїдної індукції і умов вирощування донорних рослин // Фактори експериментальної еволюції: Зб. наук. праць. – К.: Логос, 2008. – Т.5. – С. 254–259.
- Білинська О.В. Штучні живильні середовища для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2009. – Вип.1. – С. 91–98.
- Білинська О.В., Дульнев П.Г. Використання модифікованого крохмалю як гелеутворюючого компоненту штучних живильних середовищ для індукції новоутворень і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2008. – Вип.2 (14). – С. 83–89.
- Білинська О.В., Манзюк В.Т., Козаченко М.Р., Васько Н.І. Біотехнологія одержання гаплоїдів ячменю і її використання для прискорення селекційного процесу // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наукових праць. – К.: Логос, 2007. – Т.2. – С. 448–452.
- Білинська О.В., Тимчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезізова О.Ю. Патент 34859 Україна МКВ А 01 G7/00, С 12 N5/00. Спосіб одержання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Заявник і патентовласник Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва. – u200803639; заявл. 21.03.2008. – Опубл. 28.08.2008, Бюл. №16.

- Білинська О.В., Тимчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезізова О.Ю. Патент 42192 Україна МКВ А 01 G7/00, С 12 N5/00. Спосіб підвищення виходу зелених рослин-регенерантів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Заявник і патентовласник Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва. – u200900757; заявл. 02.02.2009. – Опубл. 25.06.2009, Бюл. №12.
- Дульнев П.Г., Кондратенко С.І., Чернишенко Т.В. та ін. Деклараційний патент на винахід 52031 Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів. Заявник і патентовласник Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАНУ. – u2002010237; заявл. 09.01.2002. – Опубл. 17.01.2005, Бюл. №12.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас. – М.: Наука, 2005. – 99с.
- Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Московского университета, 1964. – 367с.
- Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум К. Избранные методы исследования крахмала. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 183с.
- Сулима Ю.Ю., Календарь Р.Н., Сиволап Ю.М. Картирование генома ячменя RAPD-анализом с использованием дигиплоидных линий // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34, №4. – С. 41–49.
- Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley // Plant breeding review. – 1985. – Vol.3. – P. 219–252.
- 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.
- Coe E., Polacco M. Maize gene list and working maps // Maize Genet. Newslett. – 1994. – Vol.68. – P. 156–191.
- Gonzàes M., Hernàndes I., Jouve N. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale // Plant Breeding. – 1997. – Vol.116. – P. 302–304.
- Halberg N., Olesen A., Tuvešson K.D., Andersen S.B. Genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) with high anther-culture response through hybridization // Plant Breeding. – 1990. – Vol.105. – P. 89–94.
- Jähne-Gärtner A., Lörtz H. Protocols for anther and microspore culture of barley // Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols / Edit. R.D.Hall. – Totowa: Yumana Press Inc., 1995. – Vol.111. – P. 269–271.
- Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture // Ztsch. Pflanzenphysiol. – 1978. – Vol.86, №5. – P. 463–472.
- Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production haploid in frequencies sufficient for barley breeding programs // Plant Cell Rept. – 1989. – Vol.8, №2. – P. 110–118.
- Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // Agricultural and Food Science in Finland. – 1998. – Vol.6. – P. 389–398.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15. – P. 473–497.
- Thomas W.T.B., Forster B.P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding // Doubled haploid production in crop plants. – Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. – P. 337–349.
- Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture // Annales Agr. Finnie. – 1986. – Vol.25. – P. 127–133.

Представлено: С.А.Ігнатовою / Presented by: S.A.Ignatova

Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком / Recommended for publishing by: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 15.02.2010.

© О.В.Білинська, 2010
© O.V.Bilynska, 2010