

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ АНДРОГЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ЯЧМЕНЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ, СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ПЛОТНОСТИ ИНОКУЛЯЦИИ ПЫЛЬНИКОВ

©2013 Е.В. Белинская

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины, г. Харьков

Поступила 05.06.2013

Изучали возможность одноэтапного получения растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro* ячменя ярового при замене агар-агара в индукционной среде кукурузным крахмалом, выделенным из зерна линии-носителя мутантного гена структуры эндосперма *su₂*, и химически модифицированным крахмалом Д-5а, а также влияние на эффективность гаплопродукционного процесса плотности инокуляции пыльников. Установлено, что на питательных средах, содержащих крахмал, снижение частоты регенерации происходило либо вследствие высокой интенсивности роста неэмбриогенного каллуса (*su₂*-крахмал), либо из-за ингибирования роста и развития эмбриоидов (химически модифицированный крахмал). Уменьшение плотности инокуляции пыльников способствовало повышению частоты регенерации растений на агаровой среде.

Ключевые слова: ячмень *Hordeum vulgare L.*, культура пыльников *in vitro*, питательная среда, агар-агар, крахмал, эмбриоидогенез, регенерация растений.

Как известно, общая схема получения андрогенных гаплоидов предусматривает культивирование пыльников на питательной среде с целью индукции аномального многократного деления гаплоидных микроспор с образованием морфогенных структур, из которых формируются растения-регенеранты [1, 2].

Обычно процесс проходит в два этапа при использовании двух типов сред. Первая среда – индукционная – содержит комплекс физиологически активных веществ, стимулирующих отклонение микроспор от гаметофитного пути развития, их многократное деление и дальнейший каллусогенез или эмбриоидогенез. Состав второй среды – регенерационной – способствует регенерации растений из перенесенных на нее морфогенных структур микроспориального происхождения. При этом наиболее быстрым и экономически выгодным путем получения гаплоидов является эмбриоидогенез – образование биполярных структур с синхронным развитием апексов корня и стебля непосредственно из многоклеточных микроспор (прямой эмбриоидогенез) или из эмбриогенного каллуса (непрямой эмбриоидогенез) [3].

Следует отметить, что высокая регенерационная способность эмбриоидов, которые могут прорасти в индукционной среде, позволяет получать гаплоиды без использования регенерационной среды, что существенно уменьшает трудоёмкость и способствует экономии материалов.

Нами впервые установлено, что замена агар-агара химически модифицированными [4, 5] и естественными крахмалами [6, 7] в индукционной среде способствовала повышению частоты прямого эмбриоидогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* пыльников ячменя ярового. В связи с этим целью исследований было изучение возможности одноэтапного получения гаплоидов этого вида растений на крахмалсодержащих средах и определение влияния плотности инокуляции пыльников на эффективность гаплопродукционного процесса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве модельного генотипа была использована линия ячменя ярового (*Hordeum vulgare L.*) ДГ00-126, полученная методом культуры пыльников *in vitro* на основе F₁ гибрида Харьковский 74×Экзотик и характеризующаяся высокой частотой образования эмбриоидов, эмбриогенного каллуса и нормально пигментированных растений-регенерантов [8].

Растения, служившие донорами пыльников, выращивали в полевых условиях. Отбор, предобработка колосьев и получение асептической культуры пыльников были проведены по методикам, опубликованным ранее [9, 10].

Пыльники культивировали на индукционных питательных средах [10], различающихся гелеобразующими компонентами. В частности, NMSмод.2 содержала 0,8% агар-агара («Difco», США); NMSsu₂ – 6,5% кукурузного крахмала, полученного из зерна линии AC-11, которая является носителем естественной мутации гена структуры эндосперма *su₂* [7]; NMS_{5a} – 12,0% химически модифицированного крахмала Д-5а [5]. Препараты крахмалов были любезно предоставлены С.М. Тымчуком и П.Г. Дульневым.

Пыльники помещали в стеклянные пробирки (10×150 мм) или стерильные пластиковые чашки Петри (d=35 мм). В каждую пробирку на «косячок» среды и в чашку Петри высаживали по 30–45 шт пыльников, вычленившихся из одного колоса. В эксперименте по изучению влияния на показатели гаплопродукции плотности инокуляции пыльников в одну пробирку высаживали пыльники, изолированные из половины колоса.

Наблюдения за индукцией и развитием морфогенных структур проводили через каждые 5-7 сут, начиная с 20-х сут с момента инокуляции пыльников. Последний подсчет количества морфогенных пыльников в обоих вариантах опыта был проведен на 35 сут от начала культивирования пыльников, после чего в контроле была проведена пересадка каллуса и эмбриоидов на среду для регенерации. Подсчет растений-регенерантов был проведен через две недели после

Белинская Елена Владимировна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: bilinska@ukr.net

пересадки в контроле и одновременно в варианте «без пересадки».

Регенерационная среда содержала соли макро- и микроэлементов по Мурасиге и Скугу [11], а также (в мг/л): мио-инозитол – 100; витамины В1, В6 и РР – по 0,5; ИУК и БАП – по 0,2, (витамины и фитогормоны – «Serva», Германия); глутамин – 100 («PRS-CODEX», Испания); сахарозу – 30 г/л («Merck», Германия), агар-агар – 0,8% («Difco», США); pH 5,7-5,8.

Показателями эффективности экспериментального андрогенеза *in vitro* служили количество морфогенных пыльников, зеленых и хлорофиллдефектных растений в процентах от общего количества пыльников, высаженных на среду. В варианте «без пересадки» также было определено количество дифференцированных эмбрионов, которые не проросли.

Экспериментальные данные обработаны при помощи методов дисперсионного анализа и вариационной статистики [12] с использованием пакета программ «ОСГЭ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения показали, что через 20 сут после инокуляции пыльников на питательную среду имело место интенсивное образование морфогенных макро-структур – каллуса и эмбрионов на всех средах. Затем в пробирках с агаровой NMSмод.2 и крахмалсодержащей средой NMSsu₂, которые были оставлены для одноэтапного получения гаплоидов, происходило разрастание каллуса с формированием сплошной массы, среди которой были видны эмбриоды, и проростание последних с образованием растений-регенерантов (рис. 1)

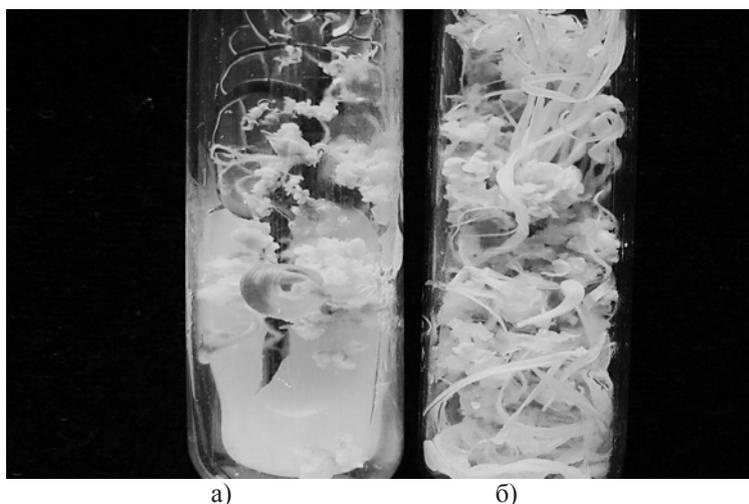


Рис. 1. Регенерация растений в культуре пыльников *in vitro* линии ячменя ярового ДГ00-126 на индукционной среде: а – с химически модифицированным крахмалом Д-5а; б – с агар-агаром через 40 сут после инокуляции пыльников

Результаты эксперимента (табл. 1) свидетельствуют о том, что в целом не удалось решить поставленную задачу по получению растений без пересадки морфогенных структур на регенерационную среду. Отсутствие достоверных различий по количеству эмбриогенных пыльников на средах с однотипным гелеобразователем можно считать подтверждением одинаковых стартовых условий про-

цесса регенерации растений. Однако высокая частота индукции андрогенных структур и интенсивный рост каллуса, которые свойственны линии ДГ00-126, при ограниченной площади питания в вариантах «без пересадки» привели, очевидно, к конкуренции между ними и потере способности к регенерации, в том числе и эмбриодами. Так, на обеих средах не проросло более 22% эмбрионов.

Таблица 1. Индукция морфогенных структур и регенерация растений в культуре пыльников *in vitro* линии ячменя ярового ДГ00-126 в зависимости от способа регенерации растений и гелеобразующего компонента питательной среды (2009 г.)

Среда	Высажено пыльников, шт.	Получено						
		морфогенных пыльников		зеленых растений-регенерантов		растений-альбиносов		количество эмбрионов ³
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	
NMSмод.2(п) ¹	248	102	41,13	66	26,61	37	14,92	–
NMSмод.2(бп) ²	152	56	36,84	23	15,13	44	28,97	23,11
NMSsu ₂ (п) ¹	225	74	32,89	88	39,11	24	10,67	–
NMSsu ₂ (бп) ²	167	52	31,13	15	8,98	16	9,58	22,15
HCP ₀₅			9,45		8,17		6,98	–

Прим. NMSмод.2 – 0,8 % агар-агара; NMSsu₂ – 6,5 % кукурузного крахмала типа su₂. 1 – морфогенные структуры пересаживали на среду для регенерации; 2 – регенерация происходила на индукционной среде без пересадки; 3 – эмбриоды, которые не проросли на индукционной среде

Следует отметить, что более интенсивный рост каллуса наблюдался на среде, содержащей *su*₂-крахмал, и следствием «перерастания» культуры было многократное уменьшение частоты регенерации растений. Поскольку в ходе эксперимента выяснилось, что проблемой одноэтапного получения гаплоидов ячменя является высокая интенсивность роста каллуса с низкой регенерационной способностью, который заполняет весь объем пробирки, препятствуя реализации морфогенетического потенциала культуры, логичными шагами в направлении повышения выхода растений-регенерантов представлялось использование компонентов питательной среды, которые снижают скорость нарастания каллусной массы, а также увеличение площади питания за счет уменьшения плотности инокуляции пыльников.

Принимая во внимание то, что на питательных средах, которые содержали вместо агар-агара химически модифицированные крахмалы, наряду со

стимуляцией прямого эмбриоидогенеза снижался рост каллуса [7, 8], один из этих препаратов – Д-5а – был использован для разработки методики одноэтапного получения гаплоидов ячменя. В качестве культуральных сосудов были использованы чашки Петри, что обеспечивало большую площадь питания для развивающихся морфогенных структур.

Исследования показали, что увеличение площади питания на агаровой среде привело к нивелированию различий по показателям гаплопродукции в вариантах «пересадка» и «без пересадки» андрогенных структур на среду для регенерации (табл. 2). При использовании химически модифицированного крахмала Д-5а в индукционной среде в сочетании с пересадкой морфогенных структур на регенерационную среду с агаром отмечено существенное возрастание частоты регенерации зеленых растений. В то же время при обнеступном получении гаплоидов эффективность регенерации была почти в 8 раз ниже.

Таблица 2. Индукция морфогенных структур и регенерация растений в культуре пыльников *in vitro* линии ячменя ярового ДГ00-126 в зависимости от способа регенерации растений и гелеобразующего компонента питательной среды (2010 г.)

Среда	Высажено пыльников, шт.	Получено					
		морфогенных пыльников		зеленых растений-регенерантов		растений-альбиносов	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
NMS _{мод.2} (п) ¹	304	144	47,36	81	26,64	16	5,26
NMS _{мод.2} (бп) ²	382	187	48,95	99	25,91	13	8,15
NMS _{5a} (п) ¹	383	149	38,90	216	56,39	55	14,36
NMS _{5a} (бп) ²	309	129	41,74	23	7,44	13	4,21
HCP ₀₅			3,69		3,13		0,97

Прим. NMS_{мод.2} – 0,8 % агар-агара; NMS_{5a} – 12,0 % химически модифицированного крахмала Д-5а. 1 – морфогенные структуры пересаживали на среду для регенерации; 2 – регенерация происходила на индукционной среде без пересадки

Это было связано с тем, что гель из крахмала Д-5а обладал более низкой по сравнению с агаровым водоудерживающей способностью, и высыхание среды снижало частоту прорастания эмбриодов (не проросло более 45 % эмбриодов). Следует отметить, что на среде, содержащей крахмал Д-5а, формировались более мелкие эмбриоды, значительная часть которых прекращала развитие на глобулярной стадии (рис. 1). В варианте «пересадка» такие структуры переносили на агаровую среду для регенерации вместе с пыльником, что способствовало их дифференциации и прорастанию с формированием растений нормальной морфологии, лишенных, к тому же, признаков витрификации.

Ввиду высокой стоимости стерильных чашек Петри одноразового использования, был проведен эксперимент по изучению влияния на эффективность регенерации растений плотности инокуляции пыльников с применением в качестве культуральных сосудов пробирок. Как видно из результатов, представленных на рис. 2, при культивировании на среде с агар-агаром пыльников, изолированных из одного колоса с пересадкой полученных андрогенных структур на регенерационную среду (КП) и без

пересадки (КБП), а также в аналогичных вариантах, но с инокуляцией на среду пыльников, вычлещенных их половины колоса (½ КП и ½ КБП), получены сравнимые результаты по количеству морфогенных пыльников. Однако при снижении плотности высаженных пыльников (варианты ½ КП и ½ КБП) отмечено существенное увеличение частоты регенерации нормально пигментированных растений, обусловленное более благоприятными условиями для дифференции и прорастания эмбриодов.

Впервые изучена возможность одноэтапного получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* при использовании в качестве гелеобразователей индукционной среды агар-агара, высокоамилозного кукурузного крахмала из зерна линии-носителя мутантного гена структуры эндосперма *su*₂ и химически модифицированного крахмала Д-5а. На средах с агар-агаром и кукурузным крахмалом в вариантах без пересадки морфогенных структур на регенерационную среду отмечен активный рост неэмбриогенного каллуса, что привело к снижению регенерационной способности культуры. Замена агар-агара химически модифицирован-

ным крахмалом Д-5а угнетала дифференциацию и прорастание эмбриоидов на индукционной среде, но в то же время способствовала существенному увеличению частоты регенерации растений при пересадке морфогенных структур на регенерацион-

ную среду с агар-агаром. Одноэтапное получение гаплоидов ячменя может быть достигнуто при снижении плотности инокуляции пыльников на агаровой среде.

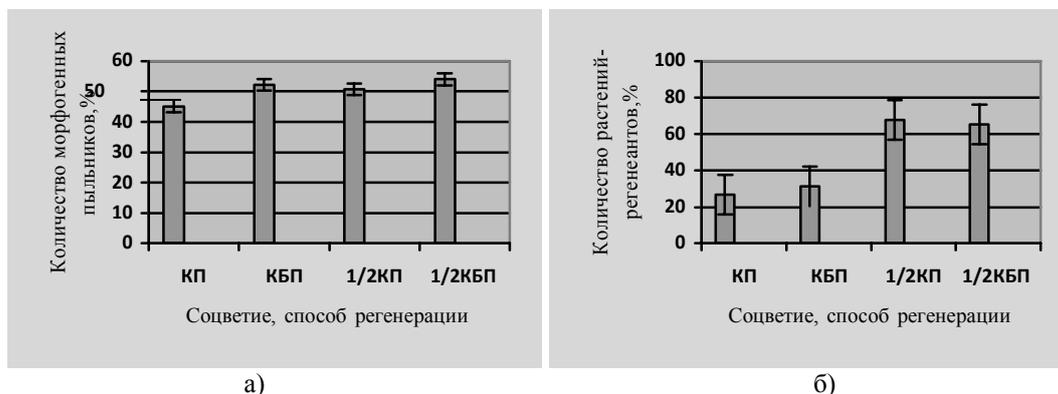


Рис. 2. Индукция морфогенных структур (а) и регенерация растений (б) в культуре пыльников *in vitro* линии ячменя ярового ДГ00-126 в зависимости от плотности инокуляции пыльников на питательную среду и способа регенерации. К – изолированы пыльники одного колоса, 1/2 К – половины колоса; П – пересадка морфогенных структур; БП – без пересадки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. V. 111. P. 269-271.
2. Szarejko I. Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Doubled haploid production in crop plants* / Ed. M. Maluszynski, K.J. Kasha, V.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. P. 35-42.
3. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно / Отв. ред. М.С. Яковлев. Л.: Наука, 1987. 103 с.
4. 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.
5. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2012. Т. 44. № 5. С. 440-448.
6. Белинская Е.В., Тымчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезинова О.Ю. Использование высокоамилозного крахмала в питательной среде для культивирования пыльников ячменя // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 6. С. 539-546.
7. Білінська О.В. 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* // *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2010. Вип. 11 (№ 905). С. 60-65.
8. Белинская Е.В. Влияние элементов технологии гаплоидной индукции на проявление генотипических особенностей морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* ярового ячменя // *Цитология и генетика*. 2010. Т. 44. № 2. С. 38-44.
9. Білінська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Харків, 1997. 19 с.
10. Белинская Е.В. Наследование способности к андрогенезу *in vitro* у ярового ячменя // *Цитология и генетика*. 2008. Т. 41. № 4. С. 27-37.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473-497.
12. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд. Московского университета, 1964. 367 с.

EFFICIENCY OF ANDROGENETIC HAPLOID PRODUCTION DEPENDING ON A MODE OF PLANT REGENERATION, MEDIUM COMPOSITION AND ANTHER INOCULATION DENSITY

©2013 E.V. Belinskaya

Yurjev Plant Production Institute of NAAS of Ukraine, Kharkov

The possibility of the one step plant production in spring barley anther culture *in vitro* via agar substitution for native corn starch obtained from the seeds of line which was a carrier of the mutant endosperm structure gene *su2* and a comically modified starch D-5a has been investigated. The effect of anther inoculation density on the efficiency of the haploid production process has also been studied. It has been shown that on the media possessing starches the lowering of the regeneration frequency was conditioned by a high intensity of nonembryogenic callus growth (*su2*-starch) or by a suppression of embryoid growth and development (chemically modified starch). A reduction of anther inoculation density has promoted a frequency of plant regeneration on agar solidified medium.

Keywords: barley *Hordeum vulgare* L., anther culture *in vitro*, nutrient medium, agar, starch, embryoid production, plant regeneration.