

УДК 633.16:631.527:752

О. В. Білінська

Вплив попередньої обробки колосся за низької температури на ефективність отримання гаплоїдів ярого ячменю у культури пиляків *in vitro*

UDC 633.16:631.527:752

O.V. Bilynska

Influence of Spike Pretreatment at Low Temperatures on Efficiency of Spring Barley Haploid Production in Anther Culture *in Vitro*

Реферат: Попередня обробка колосся за низької температури перед вилученням та інокуляцією пиляків на живильне середовище є важливим елементом технологій отримання гаплоїдів багатьох видів вищих рослин. Вказана процедура не лише сприяє подовженню оптимальної фази розвитку мікроспор, а й стимулює їх аномальний багаторазовий поділ із утворенням калюсу, ембріодів і підвищує частоту регенерації рослин. Досліджено вплив тривалості та способу попередньої обробки колосся, генотипу та складу живильного середовища на ефективність утворення морфогенних структур і регенерацію рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю. Температурному впливу 4°C піддавали зрізані пагони двох сортів і лінії ярого ячменю протягом 5 днів (контроль) та ізольоване колосся протягом 28 днів. Асептично видалені пиляки культивували на живильних середовищах, які містили солі макро- і мікроелементів відповідно до прописів N6 та MS, фізіологічно активні речовини, мальтозу та різнилися гелеутворюючими компонентами (агар-агар або хімічно модифікований крохмаль D5a-M) у оптимальних для гелеутворення концентраціях. Встановлено перевагу попередньої обробки ізольованого колосся за температури 4°C тривалістю 28 днів порівняно із зберіганням пагонів після 5-добової експозиції та доцільність застосування у складі живильного середовища крохмалю замість агар-агару. У лінії ДГ00-126 із генетично детермінованою високою здатністю до андрогенезу *in vitro* за поєднання цих методичних підходів частота регенерації нормально пігментованих рослин зростає з 23,4 до 100%.

Ключові слова: ярий ячмінь, низька температура, культура пиляків *in vitro*, агар-агар, крохмаль.

Реферат: Предварительная обработка колосьев при низкой температуре перед вычленением и инокуляцией пыльников на питательную среду является важным элементом технологии получения гаплоидов многих видов высших растений. Данная процедура не только способствует увеличению длительности оптимальной фазы развития микроспор, но и стимулирует их аномальное многократное деление с образованием каллуса, эмбрионидов и повышает частоту регенерации растений. Исследовано влияние продолжительности и способа предобработки колосьев, генотипа и гелеобразующего компонента питательной среды на эффективность образования морфогенных структур и регенерации растений в культур пыльников *in vitro* ярого ячменя. Воздействию температуры 4°C подвергали срезанные побеги двух сортов и линии в течение 5 суток (контроль) и изолированные колосья в течение 28 суток. Асептически вычлененные пыльники культивировали на питательных средах, которые содержали соли макро- и микроэлементов соответственно по прописям N6 и MS, физиологически активные вещества, мальтозу и различались гелеобразующими компонентами (агар-агар или химически модифицированный крахмал D5a-M) в оптимальных для гелеобразования концентрациях. Установлено преимущество предобработки изолированных колосьев при температуре 4°C в течение 28 суток по сравнению с хранением побегов после 5-суточной экспозиции и целесообразность использования в составе питательной среды крахмала вместо агар-агара. У линии ДГ00-126 с генетически детерминированной высокой способностью к андрогенезу *in vitro* при совместном использовании этих методических подходов частота регенерации нормально пигментированных растений возросла с 23,4 до 100%.

Ключевые слова: яровой ячмень, низкая температура, культура пыльников *in vitro*, агар-агар, крахмал.

Abstract: The spike pretreatment at low temperatures before isolating and inoculating anthers in a nutrient medium is an important element of technology for producing haploids of many species of higher plants. This procedure not only extends the optimal stage duration of microspores' development, but stimulates their abnormal multiple division with callus and embryoids formation, increases the frequency of plant regeneration as well. Here, we have studied the impact of the duration and the mode of spike pre-treatment, genotype and gel-forming component of nutrient medium on the efficiency of morphogenic structure formation and plant regeneration in spring barley *in vitro* anther cultures. The cut tillers of two varieties and line and the isolated spikes were kept at 4°C for 5 (the control) and 28 days, respectively. The aseptically isolated anthers were cultured in nutrient media, which contained salts of macro- and microelements according to the N6 and MS formulations, physiologically active substances, maltose, and differed by gel-forming components (agar or chemically modified starch D5a-M) at the concentrations optimal for gel formation. The advantage of isolated spike pretreatment at 4°C within 28 days versus the tiller storage after a 5-day exposure and the expediency to use starch instead of agar in the nutrient medium, have been established. The combination of these methodical approaches resulted in an increase in the frequency of green plant regeneration in line DH00-126 with a genetically determined high capability to *in vitro* androgenesis from 23.4 up to 100%.

Key words: spring barley, low positive temperatures, anther culture *in vitro*, agar, starch.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України, Харків, Україна

Plant Production Institute named after V. Ya. Yuryev of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Адреса для кореспонденції:

Проспект Московський, 142, м. Харків, Україна 610060;
тел.: +38 068 566-03-20
електронна пошта: bilynska_genetics@yuriev.com.ua

Address for correspondence:

142, Moskovskiy pr., Kharkiv, Ukraine 610060;
tel.: +38068 5660320
e-mail: bilynska_genetics@yuriev.com.ua

Надійшла 19.03.2019

Прийнята до друку 11.02.2020

Received 19, March, 2019

Accepted 11, February, 2020

© 2020 O.V. Bilynska. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Культура пиляків *in vitro* є універсальним методом отримання гаплоїдів вищих рослин, який ґрунтується на стимулюванні аномального багаторазового поділу мікроспор (клітин-попередників пилку з половинним набором хромосом) із подальшим утворенням калюсу чи ембріоїдів. Ці морфогенні структури за певних умов здатні до регенерації гаплоїдних рослин, подвоєння хромосомного набору яких дозволяє швидко створити константні гомозиготні лінії, що мають велику цінність для скорочення тривалості та підвищення ефективності селекційного процесу різних сільськогосподарських культур [6, 8]. Останніми роками розвиток досліджень з маркування та картування генів і розробка систем маркер-асоційованої селекції обумовили стрімке зростання інтересу до подвоєних гаплоїдів як зручного матеріалу для молекулярно-генетичного аналізу й альтернативи рекомбінантним інбредним лініям, для отримання яких необхідне самозапилення впродовж 6–8 років [16].

Слід відмітити, що для конкурентоспроможності гаплоїдних технологій з методами традиційної селекції має бути вирішено проблему масової індукції гаплоїдів, тобто їх отримання у достатній для подальшого аналізу кількості (50–100 шт.) від довільного сорту чи комбінації схрещування. Це потребує удосконалення методичних прийомів, які ініціюють гаплопродукційний процес і визначають кількісні та якісні характеристики морфогенезу *in vitro*.

Одним із таких поширених методичних прийомів є попередня обробка рослинного матеріалу в умовах низької позитивної температури (1...7°C), перед вилученням пиляків. Температура, істотно нижча за оптимальну для мікроспоро- та гаметогенезу, затримує перехід мікроспор до формування пилкових зерен і подовжує перебування мікроспор у середній чи пізній вакуолізованій фазі, що має критичне значення для успішного отримання андрогенних гаплоїдів [15]. Встановлено, що низькотемпературна попередня обробка призводить до ряду серйозних порушень метаболізму і структури клітини, які створюють передумови для дедиференціації високоспеціалізованих клітин, якими є мікроспори, та їх відхилення від нормального гаметофітного розвитку [10, 13].

Вперше дію холоду на бутони *Datura innoxia* L., призначені для подальшого вилучення з них пиляків для культури *in vitro*, застосували С. Nitsch та В. Norril [цитовано за 14]. На сьогодні відомо кілька модифікацій низькотемпературної попередньої обробки рослинного матеріалу для отримання андрогенних гаплоїдів, що засто-

Anther culture *in vitro* is a universal method for haploid production in higher plants. It is based on the stimulation of abnormal repeated division of microspores (precursors of pollen grains with a half chromosome set) which results in callus or embryoid formation. Under appropriate conditions, these morphogenic structures are capable to regenerate haploid plants, and the doubling of their chromosome number allows rapidly produce stable homozygous lines valuable for decrease a duration of crop breeding and increasing its efficiency [1, 8]. Recently, development of investigations in genetic markers and gene mapping as well as elaboration of systems for marker-assisted selection (MAS) has led to drastically increased interest to doubled haploids as a convenient material for molecular genetic analysis and alternative to recombinant inbred lines, which can be produced only via inbreeding for 6–8 years [16].

Notably, for haploid techniques to be competitive with conversional breeding methods a problem concerning mass haploid production should be solved, *i. e.* haploids should be obtained in sufficient for further analysis amount (50–100 units) from any cultivar or cross combination. This demands the improvement of methodological approaches which initiate a haploid production and determine both quantitative and qualitative traits of morphogenesis *in vitro*.

Pretreatment of plant material at low positive temperatures (1...7°C) before anther isolation is one of these widely applied methodological approaches. The temperature, significantly lower than the optimal one for microspore- and gametogenesis, delays the transition of microspores to pollen grain formation and increases a duration at the middle and the late vacuolated stages of microspore development, that is of crucial importance for successful haploid production. It was also determined that cold pretreatment led to the serious abnormalities in metabolism and cell structure, creating the premises for dedifferentiation of highly specialized microspore cells and their deviation from the normal gametophytic development [10, 13].

Nitsch and B. Norril were the first who applied the cold pretreatment to the *Datura innoxia* L. blossoms intended for anther removal and *in vitro* cultivation [cited by 14]. Nowadays, several modifications for plant material cold pretreatment to produce androgenic haploids have been known and applied according to the species taxonomy, as well as the research purposes [8].

In barley, which is an important crop, the efficiency of cold pretreatment for spikes isolated from leaf sheets and put into Petri dish was shown at 7 and

совуються відповідно до видової приналежності об'єкта та завдань досліджень [8].

Для ячменю, який є важливою сільськогосподарською культурою, показано ефективність попередньої обробки вилученого із листової піхви колосся у чашках Петрі за температури 7°C впродовж 14 діб або температури 4°C впродовж 28 діб [11]. Також доведено ефективність зберігання колосся за температури 4°C у розчині 0,3М манітолу для отримання гаплоїдів у культурі ізольованих мікроспор [12] та культурі пиляків *in vitro* [2].

Слід зазначити, що масове отримання гаплоїдів і ліній подвосних гаплоїдів для селекційних програм передбачає залучення до гаплоїдизації великої кількості гібридних комбінацій, експлантацію тисяч пиляків та регенерацію якомога більшої кількості рослин. З огляду на технічну неможливість одночасної інокуляції на живильне середовище великих обсягів рослинного матеріалу особливої актуальності набуває розроблення методів тривалого зберігання колосся в умовах низької температури без втрати мікроспорами здатності до андрогенного розвитку. Крім того, для забезпечення високого рівня реалізації морфогенного потенціалу культури після низькотемпературної обробки важливою є оптимізація складу живильних середовищ.

Результати досліджень з удосконалення попередньої обробки показали, що зберігання ізольованого колосся ярого ячменю в чашках Петрі за температури 4°C впродовж 28 діб за відомим методом [11] призвело до втрати суцвіттями тургору, аж до повного їх висихання. Натомість запропонована модифікація цього методу за того ж температурного режиму і тривалості не лише сприяла кращій збереженості колосся, зокрема відібраного з рослин, вирощених у польових умовах за несприятливого гідротермічного режиму, а й збільшенню кількості рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* [4]. Зазвичай для культивування пиляків використовують стандартне агаризоване живильне середовище [5]. У зв'язку з цим постає питання щодо можливості отримання високих гаплопродукційних показників за культивування пиляків із колосся, підданого довготривалій низькотемпературній обробці, на більш досконалих живильних середовищах, зокрема тих, у складі яких традиційний гелеутворювач агар-агар замінено на хімічно модифіковані крохмалі. Результати проведених нами досліджень довели, що саме такий методичний прийом істотно підвищує частоту регенерації рослин у культурі пиляків ярого ячменю за рахунок стимуляції утворення з мікроспор ембріодів, схожих за будовою на зародок насінини і здатних до про-

4°C within 14 and 28 days, respectively [11]. The efficiency of spike storage at 4°C in 0.3 M mannitol solution for barley haploid production both in anther [2] and isolated microspore [12] culture *in vitro* was also proven.

It should be noted that the mass haploid production in breeding programs supposes the involvement in haploidization of a large number of cross combinations, inoculation of thousands of anthers on nutrient medium and regeneration as many plants as possible. As a simultaneous inoculation on nutrient medium of a large volume of plant material is rather difficult technical task, the development of the methods allowing a long-term spike storage at low positive temperatures, preventing the loss of microspore capability to androgenic development, has appeared to be very important. Besides, the optimization of culture medium composition is considered to be of great importance for ensuring a high level of culture morphogenic potential to regeneration after cold pretreatment.

The findings on improvement of cold pretreatment showed that the storage of spring barley isolated spikes in Petri dishes at 4°C for 28 days according to the well-known method [11] led to loss of turgor up to complete drying of inflorescences. At the same time, the proposed modification of this method including the same pretreatment temperature regimen and duration not only promoted a higher survival of spikes, in particular those removed from plants grown in the field under severe drought and high temperature conditions, but also increased a number of plants regenerated in anther culture *in vitro* [6]. As usual, the basic nutrient medium solidified with agar is applied for anther cultivation [7]. In this regard, of interest is to search for the opportunity to obtain higher level of haploid production in the *in vitro* culture of anthers isolated from the spikes subjected to long-term cold pretreatment using more improved media. For the latter, the application of chemically modified starches instead of agar as the gelling agents, was found to be promising. Our findings have proven this methodological approach to significantly increase the frequency of plant regeneration in spring barley anther culture *in vitro*. This occurs due to promoting the development of microspore-derived embryoids close to seed embryo in their structure and capable to germinate and form plants, that allows achieving the regeneration more rapidly in comparison with shoot organogenesis in callus culture [5].

The research aim was to investigate the expediency of combining a long-term spike cold pretreatment and anther cultivation in the medium,



ростання з утворенням рослин, і дозволяє швидше досягти регенерації порівняно з стебловим органогенезом у калюсній культурі [3].

Мета роботи – визначення доцільності поєднання в одному технологічному процесі довготривалої попередньої низькотемпературної обробки колосся та культивування пиляків на середовищі з хімічно модифікованим крохмалем для підвищення частоти утворення морфогенних структур і регенерації нормально пігментованих рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю.

Матеріали і методи

Для досліджень використали лінію ДГ00-126, отриману нами методом культури пиляків *in vitro* на основі гібриду F1 Екзотик × Харківський 74, та сорти Екзотик і Фенікс (селекція Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН), які мали контрастну здатність до андрогенезу *in vitro*.

Рослини вирощували на дослідній ділянці. Колосся добирали в момент досягнення мікроспорами середньої та пізньої фаз розвитку, які визначали на тимчасових препаратах пиляків, забарвлених 2%-м розчином карміну у 45%-й оцтовій кислоті з використанням мікроскопа «BIOLAR SK 14» («PZO», Польща). Колосся у листовій піхві стерилізували 70%-м етиловим спиртом впродовж 10–15 хв.

Базовим було розроблене нами живильне середовище NMS мод.2 [5]. Контрольні зрізані пагони витримували у воді за температури 4°C у холодильнику в темряві впродовж 5–6 діб із подальшим культивуванням пиляків на середовищі NMSмод.2, яке містило 0,8% агар-агару («Ferak», США).

Для дослідних варіантів чутливої до андрогенезу *in vitro* лінії ДГ00-126 було передбачено попередню обробку ізольованого колосся за температури 4°C у холодильнику впродовж 28 діб у чашках Петрі діаметром 100 мм в умовах високої відносної вологості, але без прямого контакту з водою. Це досягалося на відміну від додавання кількох крапель води [11] шляхом вміщення чашки Петрі діаметром 30 мм, наповненої водою (рис. 1). Після попередньої обробки пиляки культивували на середовищі з агар-агаром (варіант 1) та хімічно модифікованим крохмалем Д5а-М у концентрації (12,0%) (варіант 2). У 3 і 4 варіантах було застосовано метод попередньої обробки ізольованого колосся, який відрізнявся від наведеного вище протоколу додатковим етапом підготовки колосся [4]. Далі пиляки культивували на середовищах із агар-агаром (варіант 3) і хімічно модифікованим крохмалем Д5а-М (варіант 4). Для генотипів із низькою здатністю до



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

Fig. 1. Pretreatment of plant material for spring barley anther culture *in vitro*: tillers in water (A); spikes without direct contact with water (B).

solidified with chemically modified starch to increase the frequency of morphogenic structure formation and normally pigmented plant regeneration in spring barley anther culture *in vitro*.

Materials and methods

Spring barley line DH00-126 produced through *in vitro* anther culture on the base of F1 hybrid Ekzotyky × Kharkivskiy 74 as well as spring barley cultivars Ekzotyky and Feniks with a contrast androgenic capacity (bred at the Plant Production Institute named after V. Ya. Yuryev of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine) were used in the investigation as model genotypes.

Plants were grown in field condition on experimental plot. Tillers were collected when microspores had reached middle or late vacuolated phases of their development. Microspore developmental stage was estimated on squash preparations of anthers, stained with 2% carmine solution in 45% acetic acid with light microscope BIOLARSK 14 (PZO, Poland). Spikes in leaf sheaths were sterilized with 70% ethanol for 10–15 min.

The developed NMSmod2 induction medium was used as a basic one [7]. Control cut tillers were kept in water at 4°C in the dark in a refrigerator for 5–6 days. After pretreatment isolated anthers were cultivated in NMSmod2 media solidified with 0.8% agar (Ferak, USA).

In experimental variants with highly androgenic line DH00-126 the pretreatment of spikes removed from leaf sheath at 4°C in a refrigerator for 28 days in Petri dishes (100 mm diameter) at a high humidity but without a direct contact with water was envisaged. This was provided by means of placing a smaller dish (30 mm diameter) with water inside Petri dish containing isolated spikes (Fig. 1) in contrast to adding a few drops of water as recommended [11]. Isolated anthers were cultivated in the

андрогенезу *in vitro* (Екзотик і Фенікс) експериментальна схема була скорочена до варіанту 3. Препарат хімічно модифікованого крохмалю було створено в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухара НАН України та надано П.Г. Дульневим. У кожному варіанті досліду на живильне середовище висаджували не менше 260 пиляків. Пробірки з пиляками витримували у термостаті без освітлення за температури 24...25°C. Спостереження проводили з 20-ї доби від початку культивування.

Калюси та ембріоїди для отримання рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MSR [3]. Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків, на яких було відмічено появу калюсу чи ембріоїдів і зелених рослин-регенерантів, у відсотках від загальної кількості висаджених пиляків.

Значущість різниці між дослідними варіантами оцінювали за HP_{05} , яку отримували за допомогою дисперсійного аналізу якісних ознак за використання програми «Microsoft Office Excel 2010» («Microsoft Corporation», США).

Результати та обговорення

Аналіз результатів досліджень виявив (таблиця), що за культивування пиляків лінії ДГ00-126, які були вилучені із колосся, витриманого за температури 4°C без прямого контакту з водою впродовж 28 діб [11], на середовищі з агар-агаром (варіант 1) показники гаплопродукції були істотно нижчі за контрольні. Заміна агар-агару хімічно модифікованим крохмалем (варіант 2) не привела до підвищення ефективності утворення морфогенних структур і регенерації рослин за використання матеріалу, обробленого цим способом. Натомість було підтверджено переваги модифікованого методу попередньої обробки [4] щодо якості колосся і пиляків після довготривалого зберігання і позитивного впливу на показники гаплопродукції. Зокрема, у лінії ДГ00-126 було відмічено істотне збільшення як кількості морфогенних пиляків, так і рослин-регенерантів за культивування пиляків на агаровому середовищі (варіант 3). При цьому останній показник підвищився більш ніж вдвічі – з 23,45 до 49,74% (таблиця). Але на найбільшу увагу заслуговують результати, отримані за застосування удосконаленого способу попередньої обробки та живильного середовища, у складі якого агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль (варіант 4). Так, у цьому варіанті досліду у лінії ДГ00-126 було отримано більше 100 рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків, що є наслідком утворення великої кількості

medium solidified with agar (variant 1) or chemically modified starch D5a-M at 12.0% concentration (variant 2) after cold pretreatment. In variants 3 and 4, the modified method of spike pretreatment differed from that one described in the protocol mentioned above by additional procedure of spike preparation [6] was applied. Then anthers were cultivated in the media containing agar (variant 3) and chemically modified starch D5a-M (variant 4). Experimental design was shortened and included only variant 3 in genotypes with a low androgenic ability (Ekzotyky and Feniks). Starch was modified at the V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine and kindly supplied by P.G. Dulniev. At least 260 anthers were inoculated in medium in each experimental variant. Tubes containing anthers were incubated at 24...25°C in the dark. Observations were carried out starting from the 20th day of cultivation beginning.

In order to obtain the regenerated plants, the calli and embryoids were transferred into modified MsSR medium [5]. The efficiency of androgenesis *in vitro* was determined as the percentages of morphogenic anthers, *i. e.* anthers with calli or embryoid appeared on their surfaces, and green plants per 100 inoculated anthers.

The significance of differences between experimental and control treatments were evaluated on the base of LSD_{05} obtained from analysis of variance (ANOVA) for qualitative traits using Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Results and discussion

Analysis of obtained results revealed that the rate of haploid production in line DH00-126 was significantly lower in comparison to the control when anthers were cultivated in agar solidified media (variant 1) after cold pretreatment at 4°C for 28 days without a direct contact with water according to the method [11]. Replacement of agar with chemically modified starch (variant 2) did not result in increased efficiency of morphogenic structure induction and plant regeneration. At the same time the advantage of modified method [6] in relation to spike and anther quality after a long-term storage and its positive effect on the traits of haploid production was verified. In particular, a significant increase both in number of morphogenic anthers and regenerated plants were established in line DH00-126 in agar solidified medium (variant 3). Notably, the latter trait increased more than twice: from 23.45 to 49.74% (Table). However, a special attention should be paid to the results ob-



Ефективність андрогенезу *in vitro* у ярого ячменю залежно від способу попередньої обробки колосся за температури 4°C та загусника живильного середовища для культивування пиляків
Dependence of efficiency of androgenesis *in vitro* in spring barley on mode of spike pretreatment at 4°C and gelling agent of nutrient media for anther cultivation

Варіант досліджу Experimental variant	Кількість висаджених пиляків, шт. Number of inoculated anthers	Морфогенні пиляки Morphogenic anthers		Зелені рослини-регенеранти Regenerated green plants	
		шт. number	%	шт. number	%
ДГ00-126 DH00-126					
Контроль Control	354	159	44,92	83	23,45
1	456	38	8,33	15	3,28
2	261	14	5,36	16	6,13
3	380	242	63,68	189	49,74
4	391	182	46,55	393	100,5
HIP ₀₅ LSD ₀₅	-	-	6,04	-	4,60
Сорт Екзотик Exotykyk					
Контроль Control	411	186	45,26	17	4,13
3	371	140	37,74	33	8,98
HIP ₀₅ LSD ₀₅	-	-	6,90	-	3,42
Сорт Фенікс Fenix					
Контроль Control	307	19	6,18	4	1,30
3	285	36	12,63	12	4,21
HIP ₀₅ LSD ₀₅	-	-	4,66	-	-

Примітки: Контроль – пагони, вода, 5 діб, агар-агар; 1 – колосся, без води, 28 діб, агар-агар; 2 – колосся, без води, 28 діб, хімічно модифікований крохмаль Д5а-М; 3 – колосся, удосконалений спосіб, 28 діб, агар-агар; 4 – колосся, удосконалений метод, 28 діб, Д5а-М (агар-агар – 0,8 %; Д5а-М – 12,0 %).

Notes: Control – tillers, water, 5 days, agar; 1 – spikes, pretreatment without water, 28 days, agar; 2 – spikes, pretreatment without water, 28 days, chemically modified starch D5a-M; 3 – spikes, improved mode of pretreatment, 28 days, agar; 4 – spikes, improved method of pretreatment, D5a-M (agar – 0.8 %; D5a-M – 12.0 %).

ембріодів на один на пиляк (в середньому 10 шт.) та їх високої регенераційної здатності. Слід зазначити, що це є найвищий вихід рослин-регенерантів, якого нам вдалося досягти у ході багаторічних досліджень із удосконалення технології отримання андрогенних гаплоїдів ячменю за використання різних методичних підходів, сортів та ліній ярого ячменю, які різнилися за походженням, комплексом біологічних і цінних господарських ознак [7].

Що стосується генотипів, які є нечутливими до андрогенезу *in vitro*, то у сорту Екзотик зменшилася інтенсивність індукції морфогенних структур у дослідному варіанті, але істотно зросла час-

tained when applying the improved method of pretreatment and the medium containing chemically modified starch instead of agar (variant 4). Particularly, there were procured more than 100 regenerated green plants per 100 cultivated anthers in this research variant in line DH00-126, resulting from the formation a large amount of embryos on the surface of one anther (in average 10) and their high regeneration ability. It should be noted that the resulted green plant yield was the highest one we have ever managed to achieve within our many year investigations on mastering the technology for barley haploid production by means of different methodological approaches and by involve-

тота регенерації рослин. У сорту Фенікс модифікований метод обробки стимулював збільшення кількості морфогенних пиляків. У той самий час відмінність за частотою регенерації зелених рослин була неістотною, хоча й спостерігалася тенденція до зростання цього показника. При цьому сорти Екзотик і Фенікс, від яких у дослідному варіанті було отримано 8,98 і 4,21% зелених рослин-регенерантів відповідно, істотно поступилися лінії ДГ00-126, незважаючи на те, що колосся і пиляки усіх досліджених генотипів не мали відмінностей за забарвленням, тургором і фазою розвитку мікроспор після дії низької температури впродовж попередньої обробки (таблиця). Для сорту Фенікс, який має довге колосся, характерна його краща збереженість.

Результати аналізу виявили різну реакцію генотипів на застосовані методичні прийоми, що відповідає загальновідомим даним щодо генотипової залежності ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* [6, 8]. Це стосується також відмінностей у реакції генотипів на тривалість попередньої обробки [9]. Раніше було встановлено, що за зберігання пагонів у воді менш чутливі до андрогенезу *in vitro* генотипи ячменю потребували скорочення тривалості низькотемпературної попередньої обробки [1]. У цьому зв'язку предметом подальших досліджень має бути вивчення можливості підвищення ефективності андрогенезу *in vitro* саме у нечутливих генотипів за рахунок зміни експозиції низькотемпературної обробки та застосування для культивування пиляків живильних середовищ, оптимізованих за фітогормональною композицією, гелеутворюючими і трофічними компонентами.

Отримані результати свідчать про можливість і доцільність поєднання довготривалої обробки ізольованого колосся ярого ячменю (рис. 2) і культивування пиляків на живильному середовищі, у складі якого агар-агар замінено на хімічно модифікований крохмаль Д5а-М, в одному технологічному процесі. Метод дозволяє компактно зберігати великі обсяги рослинного матеріалу (ізольованого колосся у чашках Петрі замість пагонів у посудинах з водою) без габаритного холодильного обладнання, що дозволяє підвищити енергоефективність. Крім того, описані підходи сприяли істотному підвищенню ефективності регенерації рослин у чутливого генотипу і, найменш, не погіршили цей показник у сортів із генетично детермінованою низькою здатністю до андрогенезу *in vitro*. Ці факти свідчать про перспективність подальших досліджень із оптимізації технології гаплоїдної індукції з урахуван-

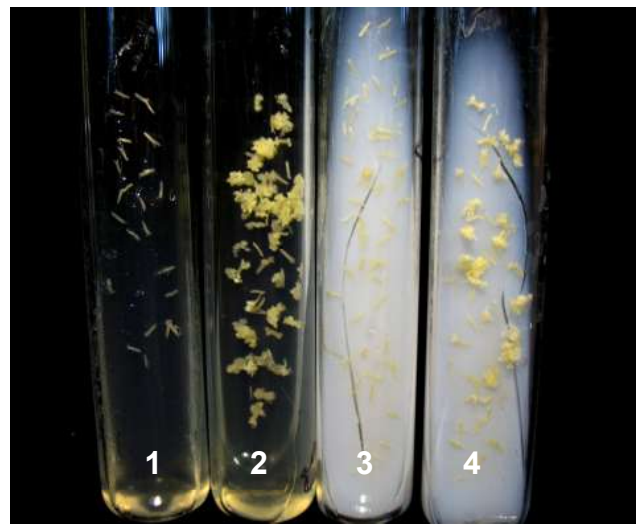


Рис. 2. Морфогенні структури, утворені у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю (лінія ДГ00-126) на живильних середовищах, які містили агар-агар та хімічно модифікований крохмаль, після попередньої обробки колосся за температури 4°C впродовж 28 діб: 1–4 варіант досліду.

Fig. 2. Morphogenic structure in spring barley (line DH00-126) anther culture *in vitro* induced after spike cold pretreatment at 4°C for 28 days on media with agar and chemically modified starch: experimental variants 1–4.

ment of varieties and lines differed in their origin, biological and valuable agronomic characteristics [4].

As to genotypes with a low ability to androgenesis *in vitro*, in variety Ekzotyky the intensity of morphogenic structure induction was reduced in contrast to an increase in the frequency of plant regeneration in experimental variant 3. In variety Feniks, an improved mode of pretreatment stimulated an increase in the number of morphogenic anthers. At the same time, the differences in the frequency of green plant regeneration were insignificant, but a visible tendency to this trait enhancement was observed. In spite of spikes and anthers of all the investigated genotypes had no differences in their color, turgor and microspore development stage after low temperature pretreatment, the varieties Ekzotyky and Feniks with 8.98 and 4.21% frequency of green plant regeneration respectively were inferior to line DH00-126 (Table). Moreover, long spikes of variety Feniks had higher preservation.

The analysis of results revealed different genotype reaction on the applied methodological approaches that corresponded to the well-known data concerning genotypic dependence of ability for *in vitro* androgenesis [1, 8]. It is also in relation to variability in genotype reaction on the duration of cold pretreatment [9]. Previous study showed that less responsive to *in vitro* androgenesis genotypes required shorter cold pretreatment for tiller storage in water [2]. For this purpose, the evaluation of



ням стимулюючого впливу низької позитивної температури на морфогенез у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю.

Висновки

1. Довготривала попередня обробка ізольованого колосся ярого ячменю за температури 4°C впродовж 28 діб із подальшим культивуванням пиляків на живильному середовищі, у складі якого агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль Д5а-М, дозволила досягти зростання частоти морфогенних пиляків та регенерації зелених рослин у культурі пиляків *in vitro* у двох із трьох досліджених генотипів.

2. За культивування пиляків чутливої до андрогенезу *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126, вилучених із колосся після попередньої обробки тривалістю 28 діб за температури 4°C, на середовищі з агар-агаром було отримано дворазове (із 23,45 до 49,74%) підвищення частоти регенерації зелених рослин. Поєднання зазначеної попередньої обробки колосся з культивуванням пиляків на середовищі, у складі якого замість агар-агару було використано хімічно модифікований крохмаль Д5а-М, привело до зростання виходу зелених рослин-регенерантів до 100%, що було майже у 4 рази вище, ніж у контролі.

3. Для генотипів із низькою здатністю до андрогенезу *in vitro*, у яких у кращому варіанті досліді частота регенерації зелених рослин не перевищила 9 %, актуальними є дослідження впливу тривалості та температурного режиму попередньої обробки, складу живильного середовища з метою визначення оптимальних параметрів технології гаплоїдної індукції.

Література

1. Белинская ЕВ. Влияние генотипа, условий выращивания и предобработки донорных растений на эффективность андрогенеза у ячменя. В: Современные проблемы генетики и селекции сельскохозяйственных растений: материалы Все-союзной научно-технической конференции молодых ученых; 1991 г., 22–26 апреля, Одесса. Одесса, 1991. с. 12.
2. Белинская ЕВ. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*. Физиология и биохимия культурных растений. 2005; 37(5): 436–42.
3. Белинская ЕВ, Дульнев ПГ. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*. Физиология и биохимия культурных растений. 2007; 39(2): 136–43.
4. Білінська ОВ, винахідник; Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, патентовласник. Спосіб попередньої обробки рослинного матеріалу для отримання гаплоїдів ячменю ярого у культурі пиляків *in vitro*. Патент України № 113261. 26.12.2016.

possibility to increase the efficiency of *in vitro* androgenesis in nonresponsive genotypes via alteration in the cold pretreatment exposure as well as the application of media with improved phytohormone composition, gelling agents and trophic components should be an object of further investigations.

Our findings showed the possibility and expediency of combination of long-term spring barley isolated spike pretreatment (Fig. 2) and anther cultivation in the medium solidified with chemically modified starch D5a-M instead of agar in an integrated technological process. This method allows a compact storage of large volumes of plant material (isolated spikes in Petri dishes instead of tillers rinsed in water) without large refrigerator equipment, resulting in decrease in energy consumption. Besides, the described approaches promoted a sufficient increase in the efficiency of plant regeneration in responsive genotype and, at least, did not decrease this trait in genotypes possessing genetically determining low androgenic ability. These facts testify to the prospects of further investigations in improvement of haploid induction technique, and they should be carried out taking into consideration a stimulating effect of low positive temperature on morphogenesis in spring barley anther culture *in vitro*.

Conclusions

1. Long-term pretreatment of spring barley isolated spikes at 4°C for 28 days followed by anther cultivation in the medium solidified with chemically modified starch D5a-M instead of agar allowed to reach increasing both in the frequencies of morphogenic anthers and green plant regeneration in anther culture *in vitro* in two among three investigated genotypes.

2. Cultivation of anthers of DH00-126 line spring barley prone to androgenesis *in vitro*, isolated from spikes after their pretreatment at 4°C for 28 days, in the medium containing agar resulted in two-fold (from 23.45 to 49.74%) increase in the frequency of green plant regeneration. Combination of above mentioned cold pretreatment with cultivation of anthers in the medium solidified with chemically modified starch D5a-M instead of agar led to green plant yield as high as 100% that was almost four fold higher than in the control.

3. For genotypes with a low ability to androgenesis *in vitro*, in which the frequency of green plant regeneration did not exceed 9% in the best experimental variant, the investigations of the duration and temperature regimen effects of cold pretreatment aimed to determine the optimal parameters of haploid production technique are of concern.

5. Білінська ОВ, Весна СВ, Манзюк ВТ. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю. Селекція і насінництво. 2002; 86: 164–72.
6. Asif M. Application and use of haploids. In: Asif M, editor. Progress and opportunities of doubled haploid production. Heidelberg: Springer International Publishing; 2013. p. 55–70.
7. Belinskaya EV. Genotypic features of morphogenesis in spring barley anther culture. Cytol Genet. 2010; 44(2): 103–7.
8. Dunwell JM. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol J. 2010; 8 (4): 377–424.
9. 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. Int J Med Biotechnol Genetics. 2017; Suppl. 2 (003): 33–8.
10. Fábíán A, Földesiné Füredi PK, Ambrus H, et al. Effect of n-butanol and cold pretreatment on the cytoskeleton and the ultrastructure of maize microspores when cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 2015; 123(2): 257–71.
11. Huang B, Sunderland N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. Ann Bot. 1982; 49(1): 77–88.
12. Kasha K J, Simion E, Oro R, et al. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley. Euphytica. 2001; 120(3): 379–85.
13. Maraschin SF, De Periestre W, Spaink HP, et al. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male genotype perspective. J Exp Bot. 2005; 56(417): 1711–26.
14. Prakash J, Giles K. Induction and growth of androgenic haploids. Int Rev Cytol. 1987; 107: 273–92.
15. Shim YS, Kasha KJ. The influence of pretreatment on cell stage progression and the time of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. Plant Cell Rep. 2003; 23(6): 1–7.
16. Tuvesson S, Dayteg C, Hagberg P, et al. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica. 2007; 158(3): 305–12.

References

1. Asif M. Application and use of haploids. In: Asif M, editor. Progress and opportunities of doubled haploid production. Heidelberg: Springer International Publishing; 2013. p. 55–70.
2. Belinskaya EV. [Influence of donor plant genotype, growth conditions and pretreatment on the efficiency of barley androgenesis]. In: [Modern Problems of Genetics and Crop Breeding: Proceeding of All-Union young scientists' scientific and technical conference]; 1991 April 22–26, Odessa. Odessa, 1991. p. 12. Russian.
3. Belinskaya EV. [Influence of pretreatment of ears on efficiency of induction of barley haploids in anther culture *in vitro*]. Fiziologija i biokhimiia kul'turnykh rasteniy. 2005; 37(5): 436–42. Russian.
4. Belinskaya EV. Genotype features of morphogenesis in spring barley anther culture. Cytol Genet. 2010, 44(2): 103–7.
5. Belinskaya EV, Dulnyev PG. [Modified starch DKKmod as a component of nutrient medium for barley haploid production in anther culture *in vitro*]. Fiziologija i biokhimiia kul'turnykh rasteniy. 2007; (39)2: 136–43. Russian.
6. Bilynska OV, inventor; Plant Production Institute named after V.Ya. Yurjev, NAAS of Ukraine, assignee. Method of plant material pretreatment for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. Ukraine patent UA 113261.2016 Dec 26. Ukrainian.
7. Bilynska OV, Vesna SV, Manzyuk VT [Application of anther culture *in vitro* for starting material production in hullless barley breeding]. Seleksiia i nasinnytstvo. 2002; 86: 164–72. Ukrainian.
8. Dunwell JM. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol J. 2010; 8 (4): 377–424.
9. 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. Int J Med Biotechnol Genetics. 2017; S2 (003): 33–8.
10. Fábíán A, Földesiné Füredi PK, Ambrus H, et al. Effect of n-butanol and cold pretreatment on the cytoskeleton and the ultrastructure of maize microspores when cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 2015; 123(2): 257–71.
11. Huang B, Sunderland N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. Ann Bot. 1982; 49(1): 77–88.
12. Kasha KJ, Simion E, Oro R, et al. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley Euphytica. 2001; 120(3): 379–85.
13. Maraschin SF, De Periestre W, Spaink HP, et al. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male genotype perspective. J Exp Bot. 2005; 56(417): 1711–26.
14. Prakash J, Giles K. Induction and growth of androgenic haploids. Int Rev Cytol. 1987; 107: 273–92.
15. Shim YS, Kasha KJ. The influence of pretreatment on cell stage progression and the time of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. Plant Cell Rep. 2003; 23(6): 1–7.
16. Tuvesson S, Dayteg C, Hagberg P, et al. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica. 2007; 158(3): 305–12.

