

УДК 633.16:575.224.234

## **ШТУЧНІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO***

© 2009 р. О. В. Білинська

*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва*

*Української академії аграрних наук*

*(Харків, Україна)*

На основі узагальнення результатів досліджень з оптимізації складу живильних середовищ за комплексом трофічних, гелеутворюючих і фізіологічно активних компонентів з урахуванням досягнень у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* розроблено середовище для отримання гаплоїдів ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L.) у культурі пиляків. Наведено результати порівняння ефективності застосування власної розробки і прописів середовищ, запропонованих іншими авторами.

**Ключові слова:** *Hordeum vulgare* L., культура пиляків *in vitro*, живильне середовище, калюсогенез, ембріодогенез, регенерація рослин

Культура пиляків та культура ізольованих мікроспор *in vitro*, як найбільш поширені методи отримання гаплоїдів і ліній подвоєних гаплоїдів пшениці, ячменю та інших видів сільськогосподарських рослин, знаходять застосування у різних селекційних програмах, забезпечуючи істотне скорочення тривалості селекційного процесу (Білинська, 2006; Choo et al., 1985; Thomas et al., 2003). Окрім цього, беззаперечні переваги гомозиготності сприяють широкому використанню рекомбінантних ліній подвоєних гаплоїдів у генетичних дослідженнях з маркування і картування геномів (Сулима и др., 1998; Sarrafi, 2006). Відомі вдалі спроби одержання гомозиготних трансформантів при використанні ізольованих мікроспор як експлантів для генетичної трансформації (Carlson et al., 2001; Kumlehn, 2006).

Аналіз літературних джерел переконливо свідчить про те, що ці досягнення стали можливими завдяки розробці теоретичних і методичних основ експериментального андрогенезу *in vitro* і значною мірою удосконаленню складу штучних живильних середовищ для культивування пиляків і регенерації рослин. Зокрема,

наприкінці 70-х років минулого століття для культивування пиляків представників родини злакових китайськими дослідниками були запропоновані середовища N6 (Chu, 1978), яке відрізнялося від відомого середовища MS (Murashige, Skoog, 1962) зменшеним вмістом амонійного азоту, і середовища з картопляним екстрактом – Potato II (Chuang, Quang, 1978).

Якісно новий рівень досліджень у галузі отримання андрогенних гаплоїдів ячменю було досягнуто у 80-90-і роки при використанні замість сахарози мальтози (Hunter, 1987) та мелібіози (Sorvari, Schider, 1987), рідких живильних середовищ з фіколом (Као, 1991), заміні агар-агару агарозою (Kohlenbach, Wernike, 1978) чи ячмінним крохмалем (Kuhlmann, Foroughi-Wehr, 1989).

Подальші модифікації полягали у зниженні вмісту мінерального і підвищенні кількості органічного азоту шляхом введення у високі концентрації глутаміну (Olsen, 1987), а також у використанні замість 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти) менш активних стимуляторів росту ауксинової дії, зокрема ФОК (феноксіоцтової кислоти) (Kasha et al., 2000). Саме на цій основі було складено прописи середовищ FHG (Kasha et al., 2000) та Jähne-Gärtner і Lörtz (Jähne-Gärtner, Lörtz, 1995), які рекомендовані для одержання гаплоїдів ячменю

---

Адреса для кореспонденції: Білинська Олена Володимирівна, Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН, пр. Московський, 142, Харків, 61060, Україна;  
e-mail: bilinska@ukr.net

у культурі пиляків та ізолюваних мікоспор *in vitro*.

Високо оцінюючи значення цих розробок для розвитку біотехнології ячменю, слід зауважити, що відпрацьовані на модельних генотипах, переважно сорти озимого ячменю Iggi, вони не завжди придатні для використання у роботі з матеріалом, який створюється у рамках певних селекційних програм. Тому перевага, як правило, надається власним методичним розробкам.

У статті узагальнено результати досліджень з удосконалення складу штучних живильних середовищ для культивування *in vitro* пиляків ярого ячменю, проведені впродовж 2001–2007 рр. Наведено склад штучного живильного середовища NMSмод.2, яке використовується в селекційних програмах з гаплоїдної селекції ячменю в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН (Білинська, 1997; 2006; Білинська та ін., 2002). Представлено порівняльну характеристику показників гаплопродукції при застосуванні середовища NMSмод.2 і середовищ з найбільш ефективних протоколів отримання андрогенних гаплоїдів ячменю (Jähne-Gärtner, Lörtz, 1995; Kasha et al., 2000).

## МЕТОДИКА

Матеріалом для досліджень були сорти ярого ячменю Екзотик, Фенікс і лінія ДГ00-126, створена нами методом культури пиляків *in vitro* на основі гібрида F1 Харківський 74 × Екзотик.

Залучені до експериментів генотипи характеризуються контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*. Зокрема, сорт Фенікс має низьку здатність до утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів. Сорту Екзотик притаманні високий вихід новоутворень і низька частота регенерації зелених рослин, а лінії ДГ00-126 – високий рівень усіх показників гаплопродукції з переважанням серед регенерантів нормально пігментованих рослин.

Вирощування рослин-донорів пиляків, добір колосся, його попередню обробку в умовах низької позитивної температури, одержання асептичної культури пиляків *in vitro* проводили згідно з описаними раніше методиками (Білинська, 1997; Білинська та ін., 2002).

Схемами дослідів передбачалося вивчення морфогенетичного ефекту мінеральних і органічних компонентів штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro*. Контролем слугувало середовище NMS мод.2,

яке містило солі макроелементів N6 (Chu, 1978), солі мікроелементів MS (Murashige, Skoog, 1962), а також у мг/л: 2,4-Д – 2; БАП (6-бензиламінопурін) – 0,5; вітаміни B<sub>1</sub> – 1, B<sub>6</sub> і PP – 0,5; міо-інозитол – 100; амінокислоти аланін, пролін, глутамін – по 100; лактальбумін – 300, картопляний екстракт – 30,0 % (від об'єму середовища), крохмаль – 1,0 %, мальтоза – 9,0 %, агар-агар – 0,76 % (“Difco”, США), рН 5,7–5,8.

Калус і ембріоїди пересаджували на регенераційне живильне середовище: мінеральна основа MS, вітаміни B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> і PP по 0,5 мг/л; ІОК і БАП по 0,1 або 0,5 мг/л, глутамін, міо-інозитол по 100 мг/л; сахароза – 30 г/л; агар-агар („Difco”, США) – 0,8 %.

Визначали такі показники: кількість морфогенних пиляків, тобто пиляків, на поверхні яких сформувалися новоутворення – калус чи ембріоїди, кількість зелених рослин та рослин-альбіносів у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків. Експериментальні дані оброблені методом дисперсійного аналізу (Плохинский, 1964).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Загальний вміст азоту у штучному живильному середовищі, співвідношення нітратний/амонійний та неорганічний/органічний азот є факторами, які впливають на ефективність соматичного (Halperin, Wetherell, 1965) і пилкового ембріоїдогенезу *in vitro* (Mordhorst, Lortz, 1993). Показано наявність морфогенетичного ефекту і для інших мінеральних компонентів, зокрема кальцію (Cho, Kasha, 1995). Численні літературні джерела містять інформацію щодо залежності процесів дедиференціації, росту і регенерації у культурі рослинних клітин і тканин від комплексу фізіологічно активних і трофічних речовин різної хімічної природи, різноманітних екстрактів та фізичного стану середовища (Біотехнологія..., 1989). Окрім цього, в літературі домінує точка зору, що найбільш важливим чинником стимулювання морфогенезу у культурі *in vitro* будь-яких експлантатів є їх гормональний статус, який визначається взаємодією ендогенних фітогормонів і композиції регуляторів росту середовища (Ембріологіческие, 2005; Bhaskaran, Smith, 1990). Тому оптимізація штучних живильних здійснюється, як правило, за стандартною схемою: добір базового середовища (MS, N6 тощо) з подальшим емпіричним визначенням найбільш адекватного поставленій меті якісного і кількісного складу речовин, що мають фітогормональну активність (Біотехнологія..., 1989).

Індукція новоутворень і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю залежно від складу штучного живильного середовища

Середовище	Висаджено пиляків, шт.	Одержано					
		морфогенних пиляків		зелених рослин		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
<b>Екзотик</b>							
NMS мод. 1 (контроль)	543	195	35,91	16	2,95	76	14,00
NMS <sub>NC</sub>	441	126	28,57	6	1,36	69	15,65
N	519	198	38,15	13	2,51	55	10,60
NMS <sub>N1/2</sub>	581	253	43,55	9	1,55	140	24,10
HP <sub>0,05</sub>			4,15		1,23		2,86
<b>Фенікс</b>							
NMS мод. 1 (контроль)	665	22	3,31	0	0,00	16	2,41
NMS <sub>NC</sub>	452	11	3,98	4	0,88	40	8,85
N	359	16	4,46	3	0,84	8	2,23
NMS <sub>N1/2</sub>	327	17	5,20	2	0,61	6	1,84
HP <sub>0,05</sub>			1,73		0,57		1,77

**Примітка:** Середовище NMSмод.1 – солі макроелементів за (Chu, 1978), солі мікроелементів за (Murashige, Skoog, 1962), органічні компоненти (Білінська, 1997); NMS<sub>NC</sub> – 10 мМ CaCl<sub>2</sub>; N – не містить солей мікроелементів; NMS<sub>N1/2</sub> – концентрацію солей макроелементів зменшено вдвічі і додано 750 мг/л глютаміну.

З огляду на це, у рамках програми з удосконалення технології індукції андрогенних гаплоїдів ячменю було проведено дослідження впливу на перебіг процесів індукції новоутворень і регенерації рослин штучних живильних середовищ, які різнилися за вмістом макро- і мікроелементів, джерел органічного і неорганічного азоту, стимуляторів росту і гелеутворюючих речовин.

Аналіз показників ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* сортів ярого ячменю Екзотик і Фенікс на середовищах, які різнилися за вмістом солей макро- і мікроелементів, органічного і неорганічного азоту та кальцію (табл. 1), свідчить про те, що максимальну кількість ембріогенних пиляків одержано в обох генотипів на середовищі NMS<sub>N1/2</sub>, де було вдвічі зменшено концентрацію солей макроелементів і збільшено вміст глютаміну. Але ні ця модифікація, ні збільшення концентрації CaCl<sub>2</sub> до 10 мМ суттєво не підвищили частоту регенерації зелених рослин.

Зниження у сорту Екзотик частоти регенерації зелених рослин на середовищі NMS<sub>N1/2</sub> на тлі істотного збільшення частоти ембріогенних пиляків і особливо рослин-альбіносів може свідчити про те, що зменшення концентрації інших елементів, зокрема Mg<sup>2+</sup>, який є складовою частиною хлорофілу, недоцільне.

Наступним етапом досліджень було вивчення впливу заміни композиції солей макроелементів середовища N6 на таку середовищ FHG (Kasha et al., 2000) (MS із зменшеною у 10 разів концентрацією амонійного азоту) і Potato II (Chuang, Quang, 1978).

Як свідчать дані, наведені у табл. 2, найбільш вагомим результатом цього експерименту є чотириразове зростання кількості ембріогенних пиляків (з 4,26 до 16,84%) та істотне збільшення частоти регенерації зелених рослин (до 1,26%) на модифікованому середовищі FHG у сорту Фенікс, якому притаманна низька здатність до андрогенезу *in vitro*.

У решти генотипів кращі результати було отримано у контролі (NMSмод.2). Найнижчі показники регенерації рослин одержано на середовищі Potato II, внаслідок того, що новоутворення являли собою переважно калюс з низьким регенераційним потенціалом.

З наукової і особливо практичної точки зору заслуговує на увагу порівняння ефективності наведених у літературі і власних методичних розробок. У зв'язку з цим нами було досліджено реакцію трьох модельних генотипів з контрастною здатністю до андрогенезу на культивування пиляків *in vitro* на оригінальних середовищах FHG (Kasha et al., 2000), Jähne-Gärtner та Lörtz (Jähne-Gärtner, Lörtz, 1995) і NMSмод.2 (Білінська, 2006), а також модифі-

Індукція новоутворень і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю на середовищах з різною мінеральною основою

Середовище	Висаджено пиляків, шт.	Одержано					
		морфогенних пиляків		зелених рослин		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
<b>Екзотик</b>							
NMS мод. 1 (контроль)	668	235	35,18	9	100	1,35	14,97
FHG мод.	365	51	13,98	5	34	1,37	9,31
Potato II мод.	382	98	25,65	0	3	0,00	0,78
НІР <sub>0,05</sub>			5,58			1,26	3,71
<b>Фенікс</b>							
NMS мод. 1 (контроль)	446	19	4,26	0	12	0,00	2,69
FHG мод.	386	65	16,84	4	16	1,04	4,14
Potato II мод.	357	8	2,24	0	0	0,00	0,00
НІР <sub>0,05</sub>			4,02			0,94	2,46

**Примітка:** Середовище NMS мод 1 – солі макроелементів за (Chu, 1978), солі мікроелементів за (Murashige, Skoog, 1962), органічні компоненти (Білинська, 1997); FHG мод. – солі макроелементів за (Kasha et al., 2000); Potato II мод. – солі макроелементів за (Chuang, Quang, 1978).

Індукція новоутворень і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю залежно від складу штучного живильного середовища

Середовище	Висаджено пиляків, шт.	Одержано					
		морфогенних пиляків		зелених рослин		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
<b>Екзотик</b>							
NMS мод. 2 (контроль)	636	215	33,80	18	2,45	171	26,88
FHG <sup>1</sup>	318	57	17,93	8	2,52	37	11,64
JGL <sup>2</sup>	275	81	29,46	3	1,09	2	0,73
NMS <sub>МВ</sub> <sup>3</sup>	357	92	26,06	5	1,42	25	7,08
НІР <sub>0,05</sub>			6,22		-		4,75
<b>Фенікс</b>							
NMS мод. 2 (контроль)	378	40	10,58	6	1,59	25	6,61
FHG <sup>1</sup>	219	33	15,07	10	4,57	19	8,68
JGL <sup>2</sup>	322	33	10,24	4	1,24	7	2,17
NMS <sub>МВ</sub> <sup>3</sup>	369	26	7,05	5	1,35	10	2,71
НІР <sub>0,05</sub>			4,68		2,13		3,27
<b>ДГ00-126</b>							
NMS мод. 2 (контроль)	303	91	30,03	80	26,40	41	13,53
FHG <sup>1</sup>	326	95	29,14	18	5,52	14	4,29
JGL <sup>2</sup>	290	71	24,48	33	11,38	10	3,45
NMS <sub>МВ</sub> <sup>3</sup>	263	60	22,81	40	15,21	13	4,94
НІР <sub>0,05</sub>			-		5,55		3,96

**Примітка:** <sup>1</sup>середовище (Kasha et al., 2000); <sup>2</sup>середовище (Jähne-Gärtner, Lörtz, 1995); <sup>3</sup>макро-, мікроелементи, вітаміни, амінокислоти NMSмод.2 + 1 мг/л БАП.

кованому середовищі NMSмод.МВ, яке відрізнялося від NMSмод.2 заміною 2 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л БАП на 1 мг/л БАП, як у середовищі Jähne-Gärtner та Lörtz.

Порівняльний аналіз показників ефективності пилякової культури (табл. 3) вказує на те, що при застосуванні рекомендованих у літе-

ратурі для культури *in vitro* пиляків ячменю середовищ FHG і Jähne-Gärtner та Lörtz не вдалося перевищити показники гаплопродукції, які було отримано на розробленому нами середовищі NMS мод.2. Лише у сорту Фенікс на середовищі FHG, яке містило солі макроелементів середовища MS із концентрацією амонійного

**ШТУЧНІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА**

Таблиця 4

**Індукція новоутворень і регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю залежно від гелеутворюючого і гормональних компонентів живильного середовища**

Середовище	Висаджено пиляків, шт.	Одержано					
		морфогенних пиляків		зелених рослин		рослин-альбіносів	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
<b>Екзотик</b>							
NMSмод.2 (контроль)	785	383	48,79	8	1,02	130	16,56
NMSмод.3	417	212	50,83	11	2,64	30	9,35
NMSдкк	417	76	18,22	15	3,60	104	7,19
NMSдкк <sub>1</sub>	431	169	39,21	9	2,08	165	24,94
NMS <sub>10д</sub>	459	205	44,66	10	2,18	117	38,28
NMS <sub>рад</sub>	442	212	47,96	9	1,96	106	25,49
NMS <sub>дв</sub>	413	163	39,46	4	0,97	80	23,98
HIP <sub>0,05</sub>			6,13		1,75		5,11
<b>Фенікс</b>							
NMSмод.2 (контроль)	716	76	10,61	13	1,82	67	9,36
NMSмод.3	528	32	6,06	1	0,19	14	2,65
NMSдкк	371	19	5,12	1	0,27	7	1,89
NMSдкк <sub>1</sub>	400	15	3,75	7	1,75	20	5,00
NMS <sub>10д</sub>	333	9	2,70	0	0,00	11	3,30
NMS <sub>рад</sub>	388	13	3,35	1	0,29	15	2,95
NMS <sub>дв</sub>	448	13	2,90	4	0,89	12	2,68
HIP <sub>0,05</sub>			2,96		1,21		2,70
<b>ДГ00-126</b>							
NMSмод.2 (контроль)	768	325	42,32	204	26,56	78	10,16
NMSмод.3	425	129	30,35	72	16,94	13	3,06
NMSдкк	295	105	30,59	99	33,56	32	10,85
NMSдкк <sub>1</sub>	408	119	29,17	134	32,84	71	17,40
NMS <sub>10д</sub>	438	168	38,36	127	29,00	39	8,90
NMS <sub>рад</sub>	251	125	49,80	57	22,71	17	6,77
NMS <sub>дв</sub>	475	208	43,79	125	26,32	37	7,79
HIP <sub>0,05</sub>			6,41		5,84		3,84

**Примітка** NMSмод.3 (без картопляного екстракту); NMSдкк і NMSдкк<sub>1</sub> (замінник агар-агару ДККмод. у концентрації відповідно 130 і 150 г/л); NMS<sub>10д</sub> (10 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП); NMS<sub>рад</sub> (5 мг/л ФОК + 1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП); NMS<sub>дв</sub> (1 мг/л 2,4-Д+1 мг/л БАП).

азоту зниженою у 10 разів, мало високий вміст глутаміну і містило 100 мг/л фенілоцтової кислоти (Kasha et al., 2000), вдалося одержати істотно вищий вихід зелених рослин-регенерантів – 4,57 замість 1,59 % – при тенденції до зростання кількості морфогенних пиляків (із 10,58 до 15,07%).

Слід зазначити, що подібний ефект у цього генотипу було виявлено і у попередньому досліді (табл. 2) при використанні як індукційного середовища, що містило композицію солей макроелементів FHG.

У сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 спостерігалось зниження гаплопродукційної здатності або відмінності за культуральними ознаками виявилися неістотним.

В середньому для трьох генотипів кількість морфогенних пиляків на середовищі FHG

становила 21,49±1,40 %, на середовищі JGL – 20,86±1,36 % і 26,27±1,21 % у контролі. Середній вихід нормально пігментованих рослин-регенерантів на двох перших середовищах був відповідно 4,17±0,68 % і 4,50±0,70 %, що істотно нижче, ніж на контрольному середовищі NMSмод. 2 (7,89±0,74 %).

Зміна гормонального складу середовища – з 2 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л БАП на 1 мг/л БАП (NMSMB3) – порівняно з контролем призвела до зменшення кількості морфогенних пиляків у сорту Екзотик (з 33,80 до 26,06%) і у лінії ДГ00-126 (з 30,03 до 22,81%) при тенденції до зниження цього показника у сорту Фенікс (з 7,05% до 10,58 %).

Не дали очікуваного позитивного результату й інші модифікації індукційного штучного середовища за стимуляторами росту (табл. 4).

Зокрема, 10-разове збільшення вмісту 2,4-Д (середовище NMS<sub>10д</sub>) викликало пригнічення індукції новоутворень у сорту Фенікс, істотно не вплинувши на показник „кількість морфогенних пиляків” у генотипів, чутливих до андрогенезу *in vitro*.

На середовищі NMS<sub>ралд</sub>, яке містило 5 мг/л ФОК+1 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л БАП, у лінії ДГ00-126 було одержано значно більше морфогенних пиляків, а у сорту Екзотик – хлорофілдефектних рослин порівняно з контрольним середовищем. У той же час композиція 1 мг/л 2,4-Д+1 мг/л БАП (середовище NMS<sub>дв</sub>) не підвищила гаплопродукційні показники.

В цілому у жодного із залучених до експерименту генотипів при варіюванні якісного і кількісного складу фітогормонів не виявлено зростання виходу зелених рослин-регенерантів – основного показника ефективності методу. Тому на підставі отриманих даних можна стверджувати, що в наших дослідженнях не підтверджено встановлену для культури пиляків пшениці закономірність: підвищення гаплопродукційних показників у чутливих генотипів за рахунок зменшення, а у нечутливих – збільшення концентрації екзогенних стимуляторів росту ауксиної дії (Эмбриологические ..., 2005).

Слід зазначити, що істотне зростання виходу зелених рослин-регенерантів у сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 було досягнуто лише у варіантах досліду, де досліджувався вплив гелеутворюючих речовин: агар-агар був замінений на модифікований крохмаль ДККмод. При цьому спостерігалось збільшення частки ембріоїдів серед андрогенних структур і зниження ступеня вітрифікації регенерантів. У ході подальших досліджень (2006–2007 рр.) було підтверджено позитивний вплив на гаплопродукційні показники пилякової культури ярого ячменю хімічно модифікованого крохмалю Д2 (Білинська, Дульнев, 2008).

Свідченням важливої ролі крохмалів у реалізації морфогенного потенціалу культури пиляків *in vitro* ячменю, на нашу думку, можна також вважати зниження всіх досліджуваних показників у сорту Фенікс і лінії ДГ00-126 та частоти регенерації хлорофілдефектних рослин у сорту Екзотик при вилученні зі складу середовища картопляного екстракту, який також містить крохмаль (табл. 4, середовище NMS<sub>мод.3</sub>).

З огляду на отримані експериментальні дані щодо більш істотного позитивного впливу

на морфогенез у культурі пиляків мінеральних і гелеутворюючих речовин порівняно зі стимуляторами росту, вважаємо за доцільне проведення подальших досліджень осмотичних і трофічних механізмів стимулювання андрогенезу *in vitro* у ячменю.

## ЛІТЕРАТУРА

Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro* : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 18 с.

Білинська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ярого ячменю // Наук. вісн. Націон. аграрн. ун-ту. – 2006. – № 100. – С. 13-19.

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 // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 83-89.

Білинська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво. – 2002. – Вип. 86. – С. 164-172.

Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. – М.: Наука, 1989. – 360 с.

Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1964. – 367 с.

Сулима Ю.Ю., Ю.Ю., Календарь Р.Н., Сиволан Ю.М. Картирование генома ячменя RAPD-анализом с использованием дигаплоидных линий // Молекулярная генетика и биотехнология: Мат-лы Междунар. конф. (Минск, 6-8 апреля 1998 г.). – Минск, 1998. – С. 106-107.

Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. – М.: Наука, 2005. – 99 с.

Bhaskaran S., Smith R.H. Regeneration in cereal tissue culture: a review // Crop Science. – 1990. – V. 30. – P. 1328-1336.

Carlson. A.R., Letarte J., Chen J., Kasha K.J. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein // Plant Cell Reports. – 2001. – V. 20. – P. 331-337.

Cho U.-H., Kasha K.J. The effect of calcium on ethylene production and microspore-derived Embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and

## ШТУЧНІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

- Wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures // J. Plant. Physiol. – 1995. – V. 146. – P. 677-680.
- Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley // Plant Breeding Review. – 1985. – V. 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.
- Chuang C.C., Quang T.W. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. – Peking: Science Press, 1978. – P. 51-56.
- Halperin W., Wetherell D.F. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro* // Nature. – 1965. – V. 205. – P. 519-520.
- Hunter C.P. Plant regeneration method // European patent application. – 1987. – № 0245892. – P. 8.
- Jähne-Gärtner A., Lörtz H. Protocols for anther and microspore culture of barley // Methods in Molecular Biology // Plant Cell Culture Protocols / Adit. R.D. Hall. – Totowa: Yumana Press Inc., 1995. – V. 111. – P. 269-271.
- Kao K.N. Plant formation from barley anther culture with Ficoll media // Z. Pflanzenphysiol. – 1991. – V. 103, № 5. – P. 437-443.
- Kasha K.J., Simion E., Oro R. et al. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley // Euphytica. – 2000. – V. 120, № 3. – P. 319-385.
- Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture // Ztsch. Pflanzenphysiol. – 1978. – V. 86, № 5. – P. 463-472.
- Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production haploid in frequencies sufficient for barley breeding programs // Plant Cell Rept. – 1989. – V. 8, № 2. – P. 110-118.
- Kumlehn J. Agrobacterium-mediated transfor-mation of androgenetic pollen cultures of barley and its employment in fundamental and applied research // Haploids in Higher Plants III: Abstracts of International Conference. – Vienna, 2006. – P. 27.
- Mordhorst A.P., Lortz H. Embryogenesis and development of isolated barley microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media // J. Plant Physiol. – 1993. – V. 142. – P. 485-492.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- Olsen F.L. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. The effect of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources // Carlsberg Research Communications. – 1987. – V. 52. – P. 393-404.
- Sarrafi A. Genetic control for embryo and haploid production and potential use of doubled haploid lines for QTLs in Cereals // Haploids in Higher Plants III: Abstracts of International Conference. – Vienna, 2006. – P. 28.
- Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media // Plant Breeding. – 1987. – V. 99. – P. 161-171.
- 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.

Надійшла до редакції  
14.01.2009 р.

## ARTIFICIAL NUTRIENT MEDIA FOR BARLEY HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

E. V. Bilynska

*Yujev Plant Production Institute  
of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences  
(Kharkiv, Ukraine)*

A medium for spring barley (*Hordeum vulgare* L.) haploid production in anther culture *in vitro* were developed on the base of generalization of the many year lasting study results concerning the optimization of a nutrient medium composition for a complex of nutrient, geletinized and physiologically active components and taking into account the most prominent word advances in the field of experimental androgenesis. Data from a comparison of the efficiency of own elaboration use and protocols proposed by another authors are presented.

**Key words:** *Hordeum vulgare* L., anther culture *in vitro*, nutrient media, callusogenesis, embryoidogenesis, plant regeneration

**БІЛІНСЬКА**

**ИСКУССТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДОВ ЯЧМЕНЯ  
В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO***

Е. В. Белинская

*Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева  
Украинской академии аграрных наук  
(Харьков, Украина)*

На основе обобщения результатов многолетних исследований по оптимизации состава питательных сред по комплексу трофических, гелеобразующих и физиологически активных компонентов, с учетом наиболее весомых достижений в области экспериментального андрогенеза *in vitro* разработана среда для получения гаплоидов ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в культуре пыльников. Приведены результаты сравнения эффективности использования собственной разработки и прописей сред, предложенных другими авторами.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare* L., культура пыльников *in vitro*, питательные среды, каллусогенез, эмбриогенез, регенерация растений