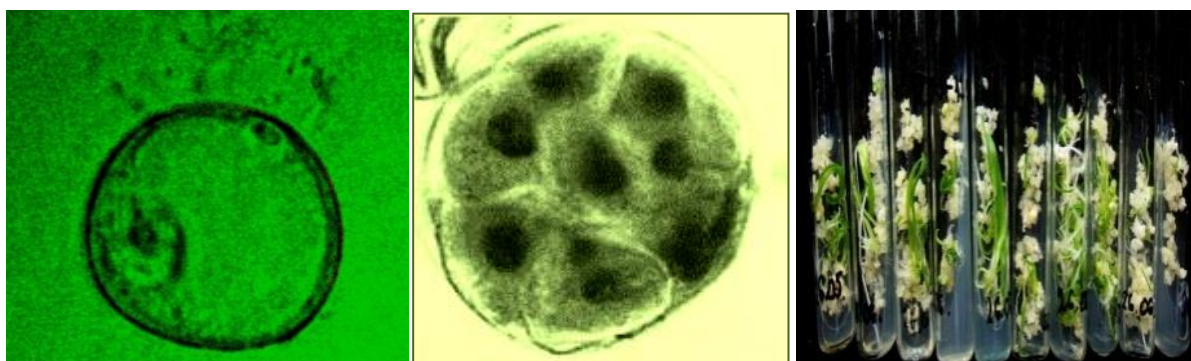


Національна академія аграрних наук України
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва



Одержання подвоєних гаплоїдів ярого ячменю методом культури пиляків *in vitro*

Методичні рекомендації



Харьків 2021

Національна академія аграрних наук України
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва

О.В. Білинська

**Одержання подвоєних гаплоїдів ярого ячменю
методом культури пиляків *in vitro***

Методичні рекомендації

Харьків 2021

Методичні рекомендації друкуються за рішенням ученої ради Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва НААН України (протокол № 10 від 23 грудня 2020 р.)

Білинська О.В.

Одержання гаплоїдів і ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю методом культури пиляків *in vitro*. Методичні рекомендації. Х.: ІР ім. В.Я. Юр'єва НААН, 2021. 42 с.

Представлено технологічну схему одержання гаплоїдів та гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*, розроблену на основі оптимізації комплексу факторів, що визначають ефективність процесів індукції спорофітного розвитку мікроспор, утворення морфогенних структур та регенерації рослин. Методичні рекомендації призначені для фахівців у галузі біотехнології, фізіології, генетики, селекції рослин, можуть бути використані для розробки завдань практичних занять для студентів біологічних та агрономічних спеціальностей закладів вищої освіти

Рецензенти:

Матвєєва Н.А. – доктор біол. наук, зав. лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Сатарова Т.М. – доктор біол. наук, професор, зав. лабораторії біотехнології Інституту зернових культур НААН України

У методичних рекомендаціях наведено опис усіх етапів технології одержання гаплоїдів і гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*: вирощування рослин-донорів пиляків, добору колосся, його попередньої обробки в умовах низької позитивної температури, контролю фази розвитку мікроспор, приготування живильних середовищ, одержання асептичної культури пиляків і морфогенних структур мікроспоріального походження, регенерації рослин та їх вирощування *ex vitro*, аналізу насінневого потомства та селекційно-генетичного вивчення ліній подвоєних гаплоїдів. Висвітлено організаційні і науково-методичні принципи експериментальних досліджень з андрогенезу *in vitro*.

Методичні рекомендації розроблено на основі узагальнення досвіду багаторічних досліджень з одержання андрогенних гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів ярого ячменю, які було проведено в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, і можуть бути рекомендовані для використання у біотехнологічних лабораторіях, які спеціалізуються на створенні вихідного селекційного матеріалу методами експериментальної гаплоїдії. Видання призначене для фахівців з біотехнології, фізіології, генетики, селекції рослин, а також для студентів та аспірантів.

Рис. 8. Табл. 4. Библ. 72.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, 2021

ЗМІСТ

Список умовних скорочень	4
Вступ.....	5
1 Морфогенез у культурі пиляків <i>in vitro</i> ячменю.....	7
2. Організація робіт у біотехнологічній лабораторії	9
2.1. Обладнання та оснащення лабораторії, забезпечення принципів асептики біотехнологічних досліджень.....	9
2.2 Підготовка приміщення та ламінарного боксу.....	11
2.3. Підготовка посуду та інструментів	11
2.4. Приготування живильних середовищ	13
3 Технологія одержання гаплоїдів і подвоєних гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків <i>in vitro</i>	16
3.1 Вирощування донорних рослин і добір колосся.....	16
3.2 Попередня обробка рослинного матеріалу.....	19
3.3 Одержання асептичної культури пиляків.....	20
3.4 Культивування пиляків, індукція андрогенних структур і регенерація рослин	21
3.5 Визначення рівня плоїдності рослин-регенерантів і диплоїдизація гаплоїдів	25
3.6 Пересадка рослин-регенерантів у ґрунт та одержання їхнього насіннєвого потомства.....	27
4 Особливості селекційного процесу за використання експериментальної гаплоїдії.....	28
5 Планування експериментів з культивування пиляків <i>in vitro</i> , статистичний аналіз результатів досліджень	30
6 Первинна документація та позначення ліній подвоєних гаплоїдів... Післямова	31 35
Перелік літературних джерел.....	36

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БАП – 6-бензиламінопурин (BAP – 6-benzylaminopurine)
2,4-Д – дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid)
НОК - α -нафтилоцтова кислота (NAA – α -naphthaleneacetic acid)
Кінетин – 6-фурфуриламінпурин (kinetin – 6-furfurylaminopurine)
В₁ – тіамін (В₁ – thiamine)
В₆ – піридоксин (В₆ – pyridoxine)
РР – нікотинова кислота (РР – nicotinic acid)
ГК₃ – гіберелінова кислота (GA3 – Gibberellic acid)

ВСТУП

Гаплоїди (від грецької ἀπλόος – простий) – це організми, соматичні клітини яких містять половинний від притаманного певному виду набір хромосом. Цінність гаплоїдів для генетичних досліджень і селекції полягає насамперед у можливості за подвоєння кількості хромосом отримати константні диплоїдні гомозиготні лінії.

Оскільки гаплоїдний статус мають клітини гаметофіту, який представлено у вищих рослин пилковим зерном (чоловічий гаметофіт) і зародковим мішком (жіночий гаметофіт), походження гаплоїдів пов'язане з аномальним розвитком цих клітин або клітин-попередників – мікро- та макроспор – у штучно створених умовах [1], а також з порушеннями при заплідненні чи ембріогенезі [2].

Гаплоїди можуть виникати спонтанно. Рослину, що утворилася таким шляхом, вперше було описано у бавовнику O.S. Atteck у 1908 р. [3]. Серед дослідників, яким вдалося виявити спонтанні гаплоїди у 20-х роках минулого століття у роді *Datura*, був А. F. Blakeslee, відомий встановленням диплоїдизуючої дії алкалоїду колхіцину з пізньоцвіту осіннього (*Colchicum autumnale* L.) [4]. Це відкриття дозволило розробити метод подвоєння хромосомного набору гаплоїдів для одержання фертильних рослин та їхнього насінневого потомства і стимулювало дослідження з індукованої, або експериментальної гаплоїдії у різних видів рослин, адже спонтанні гаплоїди утворювалися із занизькою для практичного використання у генетичних дослідженнях і селекції частотою [5].

Після відкриття явища гаплоїдії знадобилося більше 50-ти років для виявлення чинників, здатних привести до утворення з рослин з редукованою кількістю хромосом, встановлення механізмів формування гаплоїдів у різних експериментальних системах та розробки принаймні для деяких видів рослин методів масового одержання гаплоїдів.

Один з найбільш важливих та плідних напрямів експериментальної гаплоїдії був пов'язаний з дослідженням можливості індукування гаплоїдних рослин у культурі пиляків *in vitro* з мікроспор. У 1964 р. індійські дослідники S. Guha та С. Mageshwari опублікували у журналі «Nature» повідомлення про одержання гаплоїдних рослин шляхом ембріогенезу за культивування на штучному живильному середовищі пиляків *Datura stramonium* L. [6]. А у 1987 р. було підраховано, що за використання цього універсального методу експериментальної гаплоїдії вдалося індукувати гаплоїди майже у 250 видів вищих рослин, включно з найбільш економічно важливими для людства

сільськогосподарськими культурами – рисом, пшеницею, ячменем [7]. І цей список щороку поповнюється за рахунок екзотичних тропічних і декоративних, а також цінних лікарських рослин [8, 9]. Доволі високої ефективності гаплоїдної індукції було досягнуто і за використання деяких високоспеціалізованих методів, зокрема, методу «бульбозум» у ячменю [10, 11] та модифікованого методу Чейза у кукурудзи [12, 13].

Ячмінь посідає особливе місце серед важливих сільськогосподарських культур за різноманіттям та ефективністю застосування методів експериментальної гаплоїдії у селекції, генетичних та молекулярно-генетичних дослідженнях [14]. Першу вдалу спробу одержання гаплоїдних рослин ячменю у культурі пиляків *in vitro* було зроблено Р. Clapham у 1973 р. [15]. За майже 50-річну історію розвитку досліджень з експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю досягнуто великих успіхів як у теоретичному, так і практичному аспектах. Варто зазначити, що ячмінь, який є визнаним модельним об'єктом генетичних досліджень [16], набув такого ж статусу й у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* [17].

Найбільш вагомих результатів з вивчення регуляторних механізмів перепрограмування розвитку мікроспор, шляхів морфогенезу *in vitro*, розроблення та удосконалення технологій отримання андрогенних гаплоїдів ячменю досягнуто у Великій Британії [3, 18], Канаді [19, 20], Німеччині [21], Фінляндії [22–24], Іспанії [25, 26], Польщі [27, 28]. Серед країн пострадянського простору – у Казахстані [29] та Литві [30]. Переконливим свідченням конкурентоспроможності гаплоїдних технологій із традиційними у селекції ячменю можна вважати той факт, що кожний другий сорт, який створено в Європі, є похідним подвоєного гаплоїда [31].

В Україні дослідження з одержання гаплоїдів ячменю було розпочато С.Ф. Лук'янюк та С.О. Ігнатовою наприкінці 70-х років у Селекційно-генетичному інституті (м. Одеса) з опанування та удосконалення методики «бульбозом», впровадження якої у селекційний процес дозволило створити перші в СРСР сорти ярого ячменю гаплоїдного походження – Істок, Прерія та Одеський 115 [32, 33]. Згодом за сприяння одеських колег аналогічні дослідження було розгорнуто в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва (на той час – УкрНДІРСіГ ім. В.Я. Юр'єва) В.Т. Манзюком та Л.М. Наумовою [34]. Практично одночасно наприкінці 80-х років в обох згаданих вище установах було започатковано дослідження з отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*.

За результатами багаторічних комплексних досліджень в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва розроблено першу вітчизняну технологію індукції андрогенних гаплоїдів ячменю, а також вперше у СРСР отримано і

впроваджено у селекційний процес андрогенні лінії подвоєних гаплоїдів [35, 36]. Ця технологія враховує світовий досвід у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю, а також містить низку інновацій, доцільність застосування яких доведена власними експериментальними дослідженнями [37–39]. З урахування методичних розробок останніх років технологія дозволяє отримати до 100–145 нормально пігментованих-рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків на основі модельного генотипу [40, 41]. Для генетично різноманітного гібридного матеріалу вихід зелених рослин у середньому сягає 20–30 шт. на 100 культивованих пиляків, що відповідає технічній можливості одержання 1500 рослин-регенерантів і 1000 –1200 ліній одним працівником за сезон [39].

З огляду на те, що багато проблемних питань, які стосуються генотипової залежності ефективності отримання гаплоїдів, високого відсотку альбіносів серед рослин-регенерантів, необхідності зменшення трудомісткості, енергоємності та загальної вартості процесу гаплоїдної індукції, ще далекі від остаточного вирішення, розроблена технологія може слугувати основою для проведення фундаментальних, прикладних досліджень та створення більш ефективних технологічних схем.

1. МОРФОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ЯЧМЕНЮ

Гаплоїдні рослини у культурі пиляків *in vitro* ячменю та інших видів рослин утворюються з мікроспор – попередників пилку, які є високоспеціалізованими клітинами з гаплоїдним набором хромосом. Після розпаду тетрад, що формуються в результаті мейозу, мікроспора проходить кілька послідовних фаз розвитку (рання, середня, пізня) [1], які завершуються утворенням клітин з великою вакуолею і пристінним розташування ядра (рис. 1). Вакуолізована мікроспора ячменю *in vivo* після двох послідовних мітотичних поділів перетворюється на зріле пилкове зерно, що містить вегетативну клітину та два спермії. Натомість у культурі *in vitro*, тобто за інокуляції пиляків на штучне живильне середовище, відбувається багаторазовий аномальний поділ мікроспор з утворенням багатоклітинних структур та похідних від них калюсу чи ембріодів. Останнім етапом морфогенезу *in vitro* є регенерація рослин, подвоєння хромосомного набору яких дозволяє одержати насінневе потомство – лінії подвоєнних гаплоїдів (див. рис. 1).

Сукупність тичинок вищих рослин має назву андроцей (від грец. ἀνδρός – чоловік, οἶκία – помешкання, дім). Звідси походить і назва процесу утворення рослин з мікроспор або пилку – андрогенез *in vitro* (від грец. γένεσις – походження, виникнення), а гаплоїди називають андрогенними.

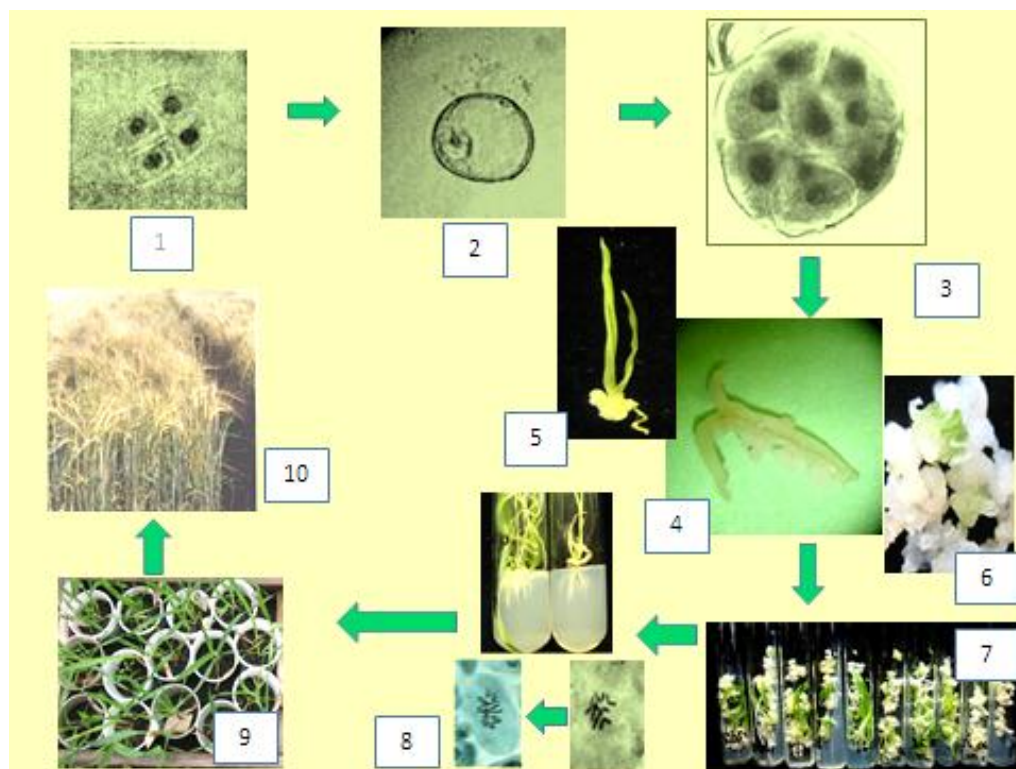


Рисунок 1. Утворення гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю: 1 – тетрада мікроспор; 2 – вакуолізована мікроспора; 3 - багатоклітинна структура мікроспоріального походження; 4 – калюс та ембріюїди, що вийшли на поверхню пиляка; 5 – проростання ембріюїда; 6 – регенерація рослин з калюсу; 7 – масова регенерація рослин; 8– визначення рівня плоідності, колхіцинування гаплоїдів; 9 – вирощування рослин-регенерантів в умовах *ex vitro*; 10 – розмноження і оцінювання ліній.

Варто зазначити, що у закордонних літературних джерелах в основному вживають саме цю термінологію [42]. Іноді використовують як синоніми терміни «пилковий ембріогенез» [43], «мікроспоріальний ембріогенез» [44]. Додавання «*in vitro*» дозволяє розрізнити явище, що ініціюється у експлантованих пиляках чи мікроспорах, від відомого у генетиці задовго до відкриття S. Guha та С. Mageshwari ембріологічного процесу, що відбувається *in vivo*, і також має назву андрогенез. Суть останнього полягає у руйнуванні ядра яйцеклітини після запліднення і утворенні зародка, що несе спадкову інформацію лише від ядра спермія [3]. Представники саратовської та уфимської шкіл ембріологів та біотехнологів для позначення процесу утворення калюсу, ембріюїдів та рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* вживають термін «андроклінія», запропонований С. С. Хохловим (від грц. $\alpha\nu\delta\rho\sigma$ — чоловічий, $\kappa\lambda\nu\omicron\varsigma$ — подібний) [5, 45].

Розрізняють прямий і непрямий андрогенез *in vitro*. За прямого андрогенезу *in vitro* з багатоклітинних структур мікроспоріального походження

утворюються соматичні ембріони, або ембріоїди – біполярні структури із стебловим і кореневим апексами, що нагадують будовою зиготичні зародки [1]. За непрямого андрогенезу *in vitro* спостерігається наростання калюсу – маси дедиференційованих клітин, яким притаманний неорганізований ріст.

Калюси характеризується гетерогенністю за морфологією, рівнем плоідності клітин та регенераційним потенціалом. Зокрема, розрізняють калюси морфогенні та неморфогенні. Серед морфогенних калюсів вирізняють ембріогенні, на поверхні яких за певних умов можуть утворюватися ембріоїди, та органогенні із меристематичними зонами пагонового чи кореневого органогенезу. Неморфогенні калюси здатні лише до активного росту, і отримання з них рослин-рагенерантів є надзвичайно складним завданням. Натомість найбільш швидкий шлях регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* забезпечується за рахунок утворення та проростання ембріоїдів. Варто зазначити, що рослини, утворені шляхом прямого андрогенезу *in vitro* або через ембріогенний калюс, мають істотно нижчий рівень гаметоклональної мінливості порівняно з регенерантами, одержаними за допомогою індукування органогенезу [46].

Очевидні переваги прямого андрогенезу *in vitro* як найбільш ефективного типу морфогенезу у культурі пиляків визначили напрями та кінцеву мету досліджень з розробки технологій гаплоїдної індукції – віднайти чинники, від яких залежить утворення ембріоїдів та регенерація рослин, і запропонувати ефективні методичні підходи для стимулювання саме ембріодогенезу.

2. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

2.1 Обладнання та оснащення лабораторії, забезпечення принципів асептики біотехнологічних досліджень

Для практичної реалізації схеми одержання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* необхідне відповідне матеріально-технічне забезпечення робіт з асептичними культурами, а також наявність технічних можливостей для вирощування рослин-донорів пиляків і рослин-регенерантів.

До організаційних заходів забезпечення принципів асептики належать структура біотехнологічної лабораторії, розміщення обладнання, порядок проведення маніпуляцій із знезараження приміщення, підготовки обладнання, рівень кваліфікації персоналу, дотримання ним трудової та технологічної дисципліни. Усі лабораторні приміщення, призначені для підготовки і проведення робіт із стерильними культурами, мають утримуватися в чистоті, бути забезпеченими пристроями для стерилізації, шафами для зберігання чистого, стерильного посуду та матеріалів. Обов'язковою умовою є просторова

ізоляція маніпуляцій із стерильним та нестерильним рослинним матеріалом, інфікованими культурами, а також недопущення до цих приміщень сторонніх осіб.

Зазвичай біотехнологічна лабораторія розміщується у кількох кімнатах, оснащених відповідним обладнанням (рис. 2, стрілками показано напрями переміщення посуду та матеріалів згідно етапів роботи).

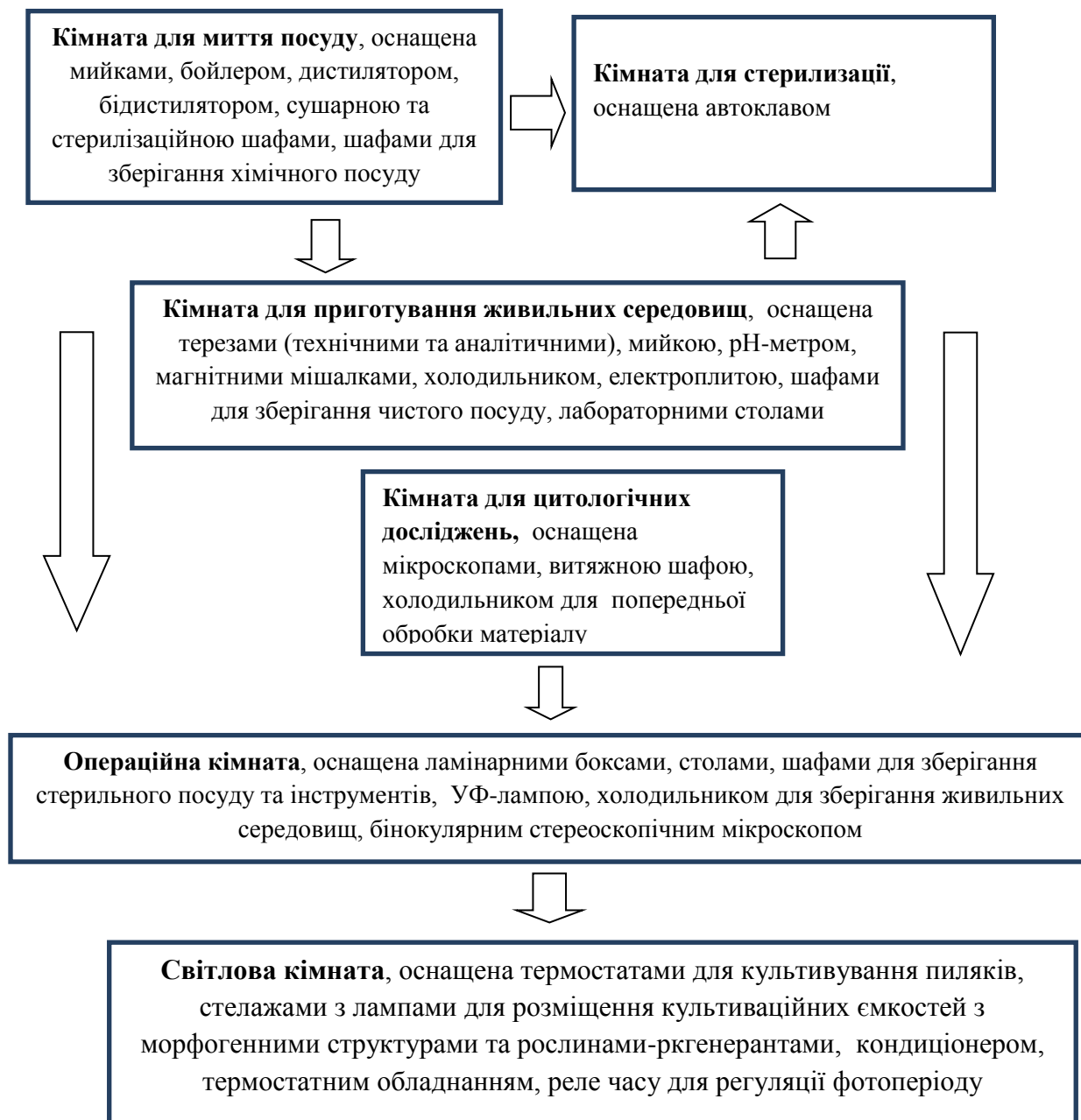


Рисунок 2. Схема і оснащення біотехнологічної лабораторії.

2.2. Підготовка приміщення та ламінарного бокса

Операційну кімнату використовують виключно для робіт в асептичних умовах. Стіни та підлога цього приміщення мусять мати покриття з кахельної плитки. Бажано запобігти проникненню до приміщення прямого сонячного світла. Для періодичного провітрювання в разі відсутності вікон кімнату варто обладнати двохпозиційним вентилятором. Підлогу миють водою з додаванням дезінфікуючих побутових засобів «Білизна» або «Domestos». Поверхні стерилізують за допомогою бактерицидної лампи, прикріпленої зазвичай до стелі. Тривалість стерилізації за допомогою ультрафіолетового опромінення становить 30–45 хв. До кімнати під час обробки ультрафіолетом заходити заборонено. Починати роботу можна не раніше однієї години після стерилізації.

Оскільки сучасні біотехнологічні лабораторії оснащені ламінарними боксами, немає необхідності проводити УФ-стерилізацію кімнати кожного разу перед роботою. Це слід робити періодично, не частіше одного разу на місяць або взагалі проводити одноразову стерилізацію перед початком сезонних робіт, щоб запобігти накопиченню у великій кількості шкідливих для здоров'я людини продуктів окислення азоту, які важчі за повітря і концентруються саме у зоні, прилеглої до підлоги, звідки поглинається повітря для очищення у системі фільтрів.

Для стабілізації потоку стерильного повітря бокс достатньо «продути», увімкнувши мотор, впродовж 30–40 хв. Робочу поверхню та бокові скляні стінки зручно обробити 70 % розчином етилового спирту за допомогою пульверизатора, а потім протерти ватою чи марлею. Перед роботою персонал миє руки з милом з подальшою дезінфекцією 70% етиловим спиртом. Для роботи в операційній кімнаті використовують змінний одяг (медичні халати з бавовни) та взуття.

2.3 Підготовка посуду та інструментів

Для культивування експлантів, приготування розчинів окремих речовин та живильних середовищ використовують різноманітний скляний та пластиковий посуд. Зокрема, для культури пиляків як культиваційні ємкості використовують скляні пробірки (16 мм×150 мм), закриті ватно-марлевими пробками, стерильні пластикові чашки Петрі (d=30 мм) одноразового використання, для вирощування рослин-регенерантів – скляні пробірки більшого розміру (20 мм×210 мм).

Розчини готують за використання мірних хімічних стаканів та циліндрів об'ємом 50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл. Безпосередньо для розчинення реактивів слід мати хімічні стакани об'ємом 50 мл і 100 мл із термостійкого

скла, що забезпечить можливість нагрівання розчину. Для приготування живильних середовищ придатними є конічні колби (колби Ерленмейєра), колби округлої форми з пласким дном місткістю 100–1000 мл, мірні стакани та циліндри.

Необхідними для роботи є також скляні градуйовані піпетки (1–10 мл), мікропіпетки (0,1–0,5 мл), автоматичні дозатори сталого та змінного об'єму, скляні воронки та палички. Для стерилізації термолабільних компонентів живильних середовищ використовують мембранні бактеріальні фільтри (наприклад, «Millipore», «Sartorius») з розміром пор не більше 22–25 мкм.

Посуд після видалення залишків живильного середовища миють шляхом замочування у гарячій воді з додаванням детергенту (наприклад, прального порошку) на 1–2 години з подальшим відмиванням за допомогою щіток та йоршів. Далі його промивають 8–10 разів під проточною водою і двічі ополіскують дистильованою водою. Нові пробірки варто обробити хромовою сумішшю (5 %-й розчин $K_2Cr_2O_7$ у концентрованій сірчаній кислоті) впродовж 1 години з подальшим ретельним відмиванням та ополіскуванням. Хромовою сумішшю періодично обробляють і скляні піпетки. Посуд висушують за кімнатної температури або у сушарній шафі.

Чистий посуд стерилізують у стерилізаційній або сушарній шафі за температури 140 ° С впродовж 1,5– 2 годин, попередньо загорнувши у крафт-папір. Для стерилізації скляних чашок Петрі можна заздалегідь виготовити двошарові пакети із крафт-паперу, край яких підгортають і фіксують канцелярською скріпкою. Ці пакети можна за такого режиму стерилізації використовувати 10–15 разів. Пробірки з ватно-марлевими пробками стерилізують вологою парою у автоклаві за тиску 1 ат, або 98066,5 Па, що відповідає температурі 120 ° С, впродовж 45–60 хв. За такого ж режиму слід стерилізувати мембранні фільтри, якщо вони попередньо не простерилізовані в умовах виробництва (не вміщені поштучно у герметичну упаковку), та пробірки з бактеріальною та грибною інфекцією.

Для видалення та інокуляції експлантів, пересадок калюсу, ембріодів та рослин-регенерантів використовують хірургічні та глазні пінцети і скальпелі, мікробіологічні петлі. Зручними для отримання асептичної культури пиляків є стоматологічні пінцети та шпателі, а також виготовлені на замовлення шпателі довжиною 20–25 см, у яких один кінець гостро заточений для видалення та інокуляції пиляків, а інший є більш широким для пересаджування калюсу та ембріодів.

Інструменти перед початком сезонних робіт стерилізують у стерилізаційній або сушарній шафі за температури 140 ° С впродовж 1,5–2 годин, попередньо загорнувши у крафт-папір, або у пакетах із крафт-паперу.

Стерелізація інструментів в автоклаві є недоречною через їх поступове пошкодження внаслідок корозії. Під час роботи у ламінарному боксі інструменти обробляють 96 % етиловим спиртом і обпалюють у полум'ї спиртівки перед вилученням пиляків із кожного нового колосу. Стерильні інструменти фіксують у гніздах металевого штативу для пробірок.

2.4 Приготування живильних середовищ

Живильні середовища для культивування рослинних клітин, тканин та органів є багатокомпонентними сумішами, які містять солі макро- та мікроелементів, а також органічні компоненти: фітогормони, вуглеводи (найчастіше сахарозу), вітаміни; можливе додавання амінокислот, різних екстрактів, соків, активованого вугілля, антибіотиків [47]. Тверді та напівтверді живильні середовища мають у своєму складі гелеутворюючі компоненти, представлені зазвичай агаром.

Для приготування середовищ використовують дистильовану або бідистильовану воду і хімічні реактиви високого ступеню очищення – кваліфікації х.ч. Це особливо важливо для солей макроелементів. Натомість для солей мікроелементів прийнятною може бути і кваліфікація ч. д. а. Високими є вимоги до якості вуглеводного компоненту та фітогормонів, Вварто надати перевагу реактивам виробництва компаній «Sigma» (США), «Merck» (Німеччина). У складі середовища для культивування пиляків (індукційне середовище) слід використовувати високоякісний агар, наприклад, бактоагар «Difco», «Ferak», «Sigma» (США). Для приготування середовищ для регенерації, стимуляції коренеутворення та дорощування рослин-регенерантів можна застосувати відмитий пластинчастий агар китайського виробництва, а також харчовий агар.

Живильні середовища готують у два етапи. Спочатку готують маточні розчини, а потім шляхом їх послідовного зливання у відповідних об'ємах в одну колбу отримують живильне середовище необхідного складу.

Маточні розчини солей макро- та мікроелементів рекомендується готувати у концентраціях, які відповідно у 10 та 100 разів перевищують їх вміст у живильному середовищі [47]. При цьому немає необхідності у 10 та 100 разів збільшувати наважку реактива, особливо при проведенні досліджень теоретичного та методичного характеру, які не потребують значних об'ємів живильних середовищ. Для отримання концентрованого розчину солей макроелементів слід послідовно розчинити у 50 мл бідистильованої води

наважки, що відповідають пропису для 1 л середовища, а потім довести об'єм бідистильованою водою до 100 мл. Для приготування 1 л середовища слід використати весь об'єм маточного розчину, 500 мл середовища – 50 мл, 100 мл середовища – 10 мл. Для приготування маточного розчину солей мікроелементів зазначені у прописі наважки збільшують у 10 разів, послідовно розчиняють у 50 мл бідистильованої води, та доводять об'єм до 100 мл. Реактиви, які входять до складу середовища у низьких концентраціях ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), слід розчинити окремо і додати до маточного розчину у кількості, що відповідає 10-кратному збільшенню їх концентрації. Зокрема, розчинити 25 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ у 10 мл води і додати до маточного розчину 1 мл, а $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ розчинити послідовно у 10 мл води і додати 0,1 мл.

У складі живильних середовищ використовують залізо у хелатній формі – у вигляді комплексної сполуки Fe-ЕДТА. Для приготування цього маточного розчину послідовно у стакані з термостійкого скла у 50–70 мл холодної бідистильованої води розчиняють послідовно 10-кратно збільшені наважки $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та $\text{Na}_2\text{-ЕДТА}$ (дигідрат дивалентної солі ЕДТА, або трилон Б), після чого розчин нагрівають, але не доводять до кипіння. Охолоджений розчин, який через утворення комплексної сполуки набуває жовтого кольору, доводять водою до 100 мл.

Розчини солей мікроелементів та хелату заліза додають до середовища із розрахунку 10 мл на 1 л.

Маточні розчини фітогормонів та вітамінів готують, виходячи з їх здатності до розчинення у спирті, розчинах кислоти або лугу. Синтетичні регулятори росту з ауксиною активністю 2,4-Д та НОК розчиняють у невеликій кількості 96 % етилового спирту, цитокініни БАП та КІН – у 0,5 н HCl , іноді при нагріванні. У деяких методичних посібниках наведено рекомендації щодо розчинення ауксинів у 1н розчинах KOH або NaOH [47]. Після розчинення кристалів розчини доводять бідистильованою водою до 100 мл. Зазвичай маточні розчини цитокінінів та ауксинів готують у концентраціях 0,1 мг/мл або 1 мг/мл.

Маточні розчини зберігають у холодильнику за температури 4–5 ° С впродовж одного–двох місяців. Вітаміни B_1 , B_6 та РР, які найчастіше використовують у складі живильних середовищ, для приготування маточного розчину розчиняють у бідистильованій воді у концентраціях 1–10 мг/мл, а потім розливають у флакони і зберігають у холодильнику за мінусової температури.

Для приготування живильного середовища необхідно послідовно злити у колбу у потрібних об'ємах маточні розчини, додати наважки сахарози, міо-

інозиту та інших речовин, відповідно до пропису. Об'єм доводять до половини від необхідного. За допомогою рН-метра за використання 1н та 0,1 н розчинів КОН (NaOH) та HCl доводять рН (5,6–5,8).

Агар розчиняють окремо у бідистильованій воді при нагріванні у половинному від потрібного об'ємі, після чого зливають з попередньо нагрітим середовищем. Після ретельного переміщування середовище розливають у культивацийні посудини, зокрема у пробірки, по 5–10 мл та піддають стерилізації в автоклаві. В разі використання як гелеутворювача крохмалю, його додають до жильного середовища, доведеного до потрібного об'єму, нагрівають до утворення рідкого клейстеру і розливають у пробірки.

Для приготування картопляного екстракту 200 г попередньо очищеної та дрібно порізаної картоплі вміщують у ємкість з 400 мл дистильованої води, доведеної до кипіння. Варять при слабкому кипінні 20–25 хв. Відвар проціжують через два шари марлі і додають із розрахунку 200–300 мл на 1 л середовища.

Зазвичай стерилізацію живильних середовищ, які розлито у ємкості невеликого об'єму (пробірки, колби 50–100 мл), проводять за тиску 0,8 атм, або 78453,2 Па, що відповідає температурі 116 °С, впродовж 15–20 хв. Такий режим забезпечує збереження активності доданих до середовища термостабільних цитокінів (БАП та КІН) та ауксинів (2,4-Д та НОК). Для колб місткістю 0,5–1 л тривалість стерилізації може становити 25–30 хв. Підготовлене до стерилізації середовище переливають у колбу, яка вдвічі перевищує його об'єм, щоб під час кипіння до виходу автоклава на режим підвищеного тиску та після відключення рідина не зволожувала пробку.

Після стерилізації пробірки з середовищем для культивування пиляків розкладають горизонтально для застигання середовища у вигляді пласкої поверхні.

Середовище з колб після автоклавування розливають у ламінарному боксі у попередньо простерилізовані скляні або стерильні пластикові чашки Петрі і витримують до застигання. Після цього чашки Петрі заклеюють плівкою «Parafilm» і зберігають в операційній кімнаті у холодильнику чи шафі за кімнатної температури.

Стерилізацію середовищ або їх окремих компонентів шляхом пропускання через бактеріальні фільтри проводять у ламінарному боксі за використання стерильного посуду та фільтрів. Знезаражені у такий спосіб розчини додають до підданих автоклавуванню розчинів гелеутворюючих речовин або базових середовищ з урахуванням певних об'ємних співвідношень, ретельно перемішують і розливають у попередньо простерилізовані скляні або пластикові стерильні культивацийні ємкості одноразового використання.

3 ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ГАПЛОЇДІВ І ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Узагальнення результатів багаторічних досліджень, спрямованих на визначення оптимальних параметрів вирощування рослин-донорів пиляків, одержання асептичної культури, культивування пиляків *in vitro*, регенерації рослин, коренеутворення, вирощування регенерантів в умовах *ex vitro* та одержання їх насінневого потомства дозволило скласти технологічну схему гаплоїдної індукції у ярого ячменю (рис. 3).

Інноваційними елементами цієї технології є обробка колосся у 0,3 М розчині маніту [48], удосконалена довготривала обробка за низької позитивної температури [40, 49], культивування пиляків на середовищах, що містять замість агару природні та хімічно модифіковані крохмалі [38, 39, 50–53].

3.1 Вирощування донорних рослин і добір колосся

Запорукою одержання високих та стабільних показників гаплопродукції у культурі пиляків *in vitro* є належна якість рослинного матеріалу. Для її забезпечення мають бути створені оптимальні умови вирощування рослин-донорів пиляків.

Найбільш придатними для одержання високоякісного рослинного матеріалу є камери штучного клімату, забезпечені технічними можливостями для регуляції температурного режиму, тривалості фотоперіоду та освітленості. Ці камери дозволяють підтримувати температурно-світлові режими, які є найбільш сприятливими саме для проведення біотехнологічних досліджень. Зокрема, для вирощування донорних рослин ярого ячменю таким режимом є температура 12 °С, яка в поєднанні з 16-годинним фотоперіодом та високою освітленістю (не менше 20 кЛк) сприяє одержанню експлантів з високим морфогенним потенціалом [37, 54]. Можливе вирощування рослин у теплицях з комбінованим освітленням, але вони не забезпечують стабільного температурного і світлового режимів.

З огляду на значні енерговитрати, пов'язані з експлуатацією камер і теплиць, імовірно, найбільш прийнятним шляхом одержання матеріалу для культури пиляків *in vitro* залишається вирощування донорних рослин у польових умовах. Однак у цьому випадку слід враховувати вплив погодних умов на ріст і розвиток рослин, особливо негативний вплив високої температури і посухи на якість рослинного матеріалу і показники гаплопродукції.

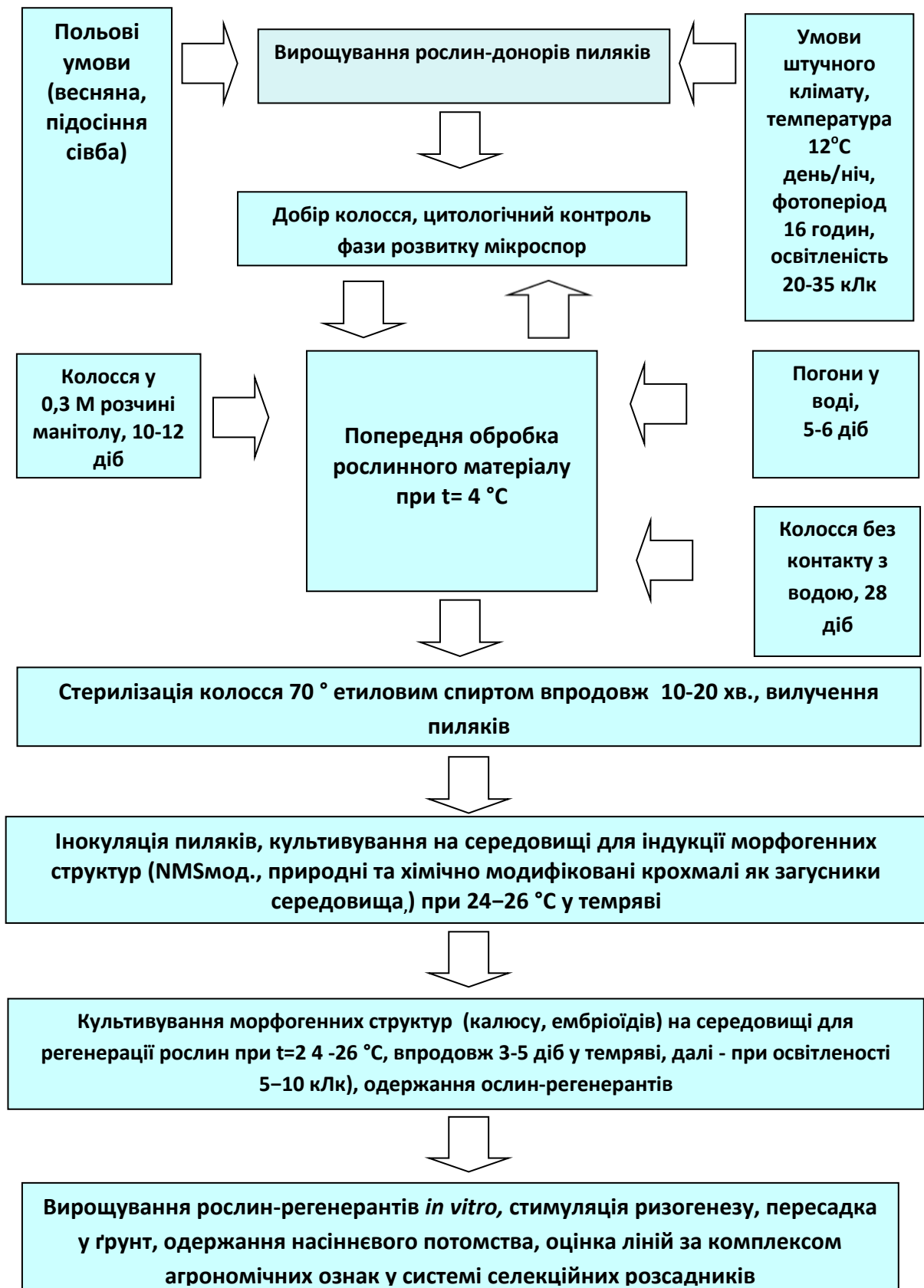


Рисунок 3. Технологічна схема одержання гаплоїдів і ліній подвоєних гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*

Розміщувати посіви ярого ячменю для біотехнологічних досліджень варто на ділянках, забезпечених можливістю штучного поливу, які розташовані на мінімально можливій відстані від лабораторії. Сівбу проводять в оптимальні строки (березень-квітень) по чорному пару ручною сівалкою. Відстань між рядками – 15 см, між рослинами – 5 см. У фазу кушіння рослини підживлюють комплексним мінеральним добривом.

Якщо дозволяють погодні умови (помірно тепла погода з опадами) або є можливість штучного поливу, можна сіяти ячмінь у серпні. Пожнивна сівба, за рахунок якої проведення робіт переноситься на менш спекотний жовтень, дозволяє вирощувати матеріал, який не лише не поступається рослинам оптимального весняного строку сівби за здатністю до андрогенезу *in vitro*, але й перевищує їх [37].

Добір колосся для вилучення пиляків здійснюють у фазу виходу в трубку, що відповідає мікроспорогенезу. Морфологічним маркером для добору колосся з мікроспорами у середній та пізній вакуолізованій фазі слугує поява флагового листка та відстань між флаговим і першим листком (h). Ця відстань буде більшою за прохолодної погоди з опадами і меншою за високої температури. Слід також враховувати генотипові відмінності. Для більшості генотипів варто добирати колосся з h від 0 до 2 см. Але для конкретних генотипів і погодних умов необхідно скорегувати цю величину за допомогою цитологічного аналізу.

Проведення цитологічного аналізу є необхідним для точного добору колосся з мікроспорами у середній та пізній вакуолізованій фазі, адже цей чинник є критичним для отримання андрогенних гаплоїдів. Фазу розвитку мікроспор визначають за допомогою світлової мікроскопії (об'єктив 20 або 40) на тимчасових препаратах пиляків за їх фарбування 1–2 % розчином карміну у 45 % оцтовій кислоті. Ацетокармін готують, розчиняючи 1–2 г барвника у розчині, що містить 45 мл льодяної оцтової кислоти і 55 мл дистильованої води, при нагріванні зі зворотним холодильником [55]. Виготовлення препаратів та приготування ацетокарміну проводять під витяжною шафою. Пиляки для цитологічного аналізу вилучають із середньої частини колоса. Пізня фаза розвитку мікроспори характеризується наявністю великої вакуолі та пристінним положенням ядра (рис. 4)

Визначення фази розвитку мікроспор проводять також перед інокуляцією пиляків на живильне середовище, добираючи за результатами аналізу однотипне колосся. Іноді може виникнути необхідність у скринінгу колосся щодо фази розвитку мікроспор безпосередньо під час вилучення пиляків.

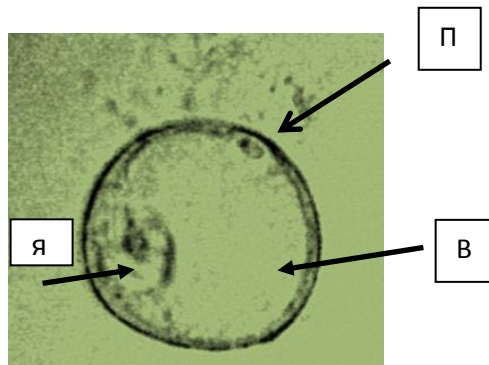


Рисунок 4. Пізня фаза розвитку вакуолізованої мікроспори ячменю: Я – ядро; В – вакуоля; П – пора. Збільшення 8×40.

Для цього мікроскоп вміщують на стіл поряд з ламінарним боксом, а один – два пиляки, вилучені у стерильних умовах, переносять на предметне скло і роздавлюють під покривним склом у краплі ацетокарміну або води.

3.2 Попередня обробка рослинного матеріалу

Попередня обробка колосся за низької позитивної температури не лише затримує перехід мікроспор до формування пилкових зерен і подовжує їх перебування в оптимальній вакуолізованій фазі, а й стимулює аномальний багаторазовий поділ з утворенням калюсу, ембріодів, підвищує частоту регенерації рослин [18, 56].

Для ячменю описано кілька способів попередньої обробки (рис. 5), які можуть бути рекомендовані для практичного використання. Найпростішим є зберігання пагонів у посудині з проточною водою у холодильнику за температури 4 ° С впродовж 5–6 діб [37]. Більш тривалим є зберігання попередньо простерилізованого та вилученого із листової піхви у стерильних умовах колосся у чашках Петрі за температури 7 ° С (14 діб) або температури 4 ° С (28 діб) [56].

За останнього способу попередньої обробки колосся зберігають у чашках Петрі (d=100 мм) в умовах високої відносної вологості, але без прямого контакту з водою, що досягалося шляхом вміщення чашки Петрі меншого діаметру (d=30 мм), наповненої водою. Доведено ефективність попередньої обробки колосся за температури 4 ° С у розчині 0,3М манітолу впродовж 10–12 діб у чашках Петрі [48]. Чашки Петрі з рослинним матеріалом заклеюють плівкою «Parafilm».

Попередня обробка колосся, вміщеного у чашки Петрі, сприяє більш компактному розміщенню великих обсягів рослинного матеріалу та не потребує великогабаритного холодильного обладнання, необхідного для зберігання пагонів у воді.



Рисунок 5. Режими і способи попередньої обробки матеріалу для одержання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*

Варто зазначити, що комбінування короткотривалої та довготривалої обробки дозволяє раціонально використати час і збільшити кількість висаджених на живильне середовище пиляків.

3.3 Одержання септичної культури пиляків

У культурного ячменю як виду з найбільш вираженим ступенем закритого цвітіння (клеистогамії) запилення і запліднення, як правило, відбувається до повного виходу колосу з листової піхви [16]. Фази мікроспорогенезу та гаметогенезу, які передують цим процесам, проходять взагалі без контакту елементів квітки з навколишнім середовищем, що робить їх вільними від епіфітної мікрофлори. Ця особливість формування генеративної сфери ячменю значно спрощує отримання асептичної культури пиляків, ізольованих мікроспор, насінневих зачатків та колосся.

Для отримання асептичної культури пиляків ячменю у нестерильних умовах від пагонів відокремлюють листя, видаляють частини пагонів під найближчим до колосу міжвузлям та на 2–3 см нижче флагового листа. Колосся у листовій піхві («трубки») протирають ватою, зволоженою 70 % спиртом, і вміщують у пластикові кювети, попередньо простерилізовані 70 % спиртом.

«Трубки» одного генотипу фіксують до купи за допомогою фольги, додаючи етикетку. Кювети з попередньо підготовленим матеріалом зберігають у холодильнику. Колосся використовують впродовж одного дня для отримання асептичної культури пиляків.

У ламінарному боксі «трубки» по 4–5 шт. вміщують між двома шарами вати, попередньо зволоженої 70 % етиловим спиртом, і витримують впродовж 10–20 хв. Менша експозиція може бути застосована для матеріалу, вирощеного в умовах кліматичної камери чи теплиці, більша – для польового матеріалу, особливо у разі прохолодної погоди з опадами під час добору пагонів. Для зменшення випаровування спирту вату обгортають фольгою. Після стерилізації колосся вилучають з листової піхви за допомогою скальпеля та пінцета, відокремлюють ості та по два нижніх та верхніх колоски. В разі закладання ізольованого колосся на довготривалу попередню обробку кількість одночасно підданих стерилізації суцвіть може бути збільшена до 10–15 шт.

Видалення пиляків із колосся зручно проводити на попередньо простерилізованих предметних скельцях, які кладуть на закриту чашку Петрі з вміщеним усередині для контрасту чорним папером. Для кожного колосу використовують нове скло, поверхню чашки протирають 70% спиртом. Можна також для видалення пиляків використовувати попередньо простерилізовані невеличкі листки крафт-паперу. У кожен пробірник або чашку Петрі висаджують пиляки з одного колосу (30–60 шт.)

3.4 Культивування пиляків, індукція морфогенних структур і регенерація рослин

Видалені з колосся пиляки культують на індукційному живильному середовищі NMSмод. 2 (табл. 1), яке містить солі макроелементів за Chu [57] і солі мікроелементів за Murashige, Skoog [58].

Середовище розливають у пробірки, які після стерилізації розкладають для застигання середовища горизонтально. Це середовище, а також середовище NMSмод. 1, яке не містить картопляного екстракту і розчинного крохмалю, слугують контролем у експериментах з оптимізації складу живильних середовищ для культивування пиляків ярого ячменю. Середовище NMSмод. 1 є базовим для удосконалення індукційного середовища за гелеутворюючими компонентами.

Виходячи з результатів проведених експериментів, рекомендується використання у складі живильних середовищ природних крохмалів кукурудзи з підвищеним вмістом амілози, які можна одержати із зерна ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму *ae* та *su₂* [38], високоамілозного крохмалю гороху (мутація *rugosus*) та крохмалю нормального типу [53].

Таблиця 1 Склад живильних середовищ для індукції морфогенних структур, регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю, вирощування рослин та стимулювання коренеутворення

Компоненти живильного середовища	Вміст, мг/л			
	NMS мод. 2	MSREG	MSG	MSR
Солі макроелементів				
NH ₄ NO ₃	–	1650,0	1650,0	825,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	–	–	–
KNO ₃	2830	1900,0	1900,0	950,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0	440,0	440,0	220,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	370,0	370,0	185,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0	170,0	85,0
Fe-ЕДТА				
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	13,9
Na ₂ -ЕДТА	37,3	37,3	37,3	18,7
Солі мікроелементів				
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	3,1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	11,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	4,3
KI	0,83	0,83	0,83	0,42
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,12
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,012
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,012
Органічні сполуки				
Тіамин-НСІ (В ₁)	1	1	1	–
Піридоксин-НСІ (В ₆)	0,5	0,5	0,5	–
Кислота нікотинова (РР)	0,5	0,5	0,5	–
Міо-інозит	100,0	100,0	100,0	100,0
Глутамін	200	100,0	–	–
Гліцин	2,0	–	–	–
Аланін	100	–	–	–
Пролін	100	–	–	–
2,4-Д	2,0	–	–	–
БАП	0,5	0,5	–	–
НОК	-	0,5	–	2,0
Бакто-триптон	500,0	-	-	-
Сахароза	–	30000,0	30000,0	20000,0
Мальтоза	90000,0	–	–	–
Картопляний екстракт	30 мл	–	–	–
Розчинний крохмаль	10000	–	–	–
Агар	8000	8000	8000	8000
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

Примітки.

NMS мод. – середовище для індукції морфогенних структур (калюсу, ембріодів)

MSREG – середовище для регенерації рослин

MSP – середовище вирощування рослин *in vitro*

MSR– середовище для стимулювання утворення коріння

Високоамілозні крохмалі додаються у концентрації 6,5 %, а крохмаль гороху нормального типу – 4,5 %. Одержують крохмалі за стандартною методикою [59].

Істотне підвищення ефективності гаплопродукційного процесу було досягнуто за рахунок заміни агар-агару хімічно модифікованими крохмаллями, створеними в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України к.х.н. П.Г. Дульневим. [39, 41, 50–52]. Найкращими препаратами для культивування пиляків ярого ячменю є Д5а, Д5а-М, Д5а-1. Ці препарати для отримання гелів із прийнятними структурно-механічними властивостями додають до живильного середовища у концентрації 12,0 %.

Пробірки та чашки Петрі з пиляками вміщують у термостат і культивують за температури 24–25 °С у темряві. Спостереження за індукцією калюсу та ембріодів починають з 20-ї доби від початку культивування, фіксуючи кількість морфогенних пиляків у кожній пробірці через 5–7 діб. Морфогенні пиляки – це пиляки, з мікроспор яких утворилися калюс чи ембріоїди, які можна побачити неозброєним оком (рис. 6).

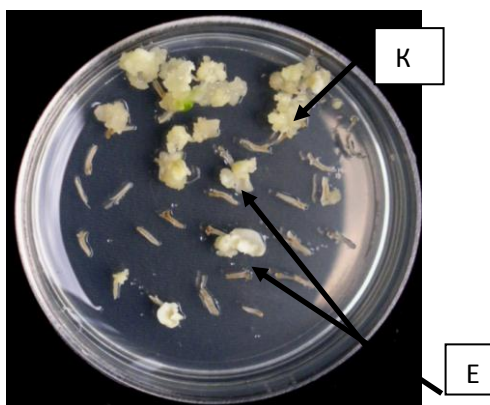


Рисунок 6. Утворення морфогенних структур у культурі пиляків ярого ячменю: К – калюс; Е – ембріоїди.

Ефективність процесу індукції визначається як кількість морфогенних пиляків у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків. Оскільки з одного пиляка може утворитися більше одного калюсу чи ембріоїда, іноді підраховують їх кількість на 100 пиляків або на один пиляк.

Ембріоїди здатні проростати на індукційному середовищі з утворенням рослин-регенерантів. Але для масової регенерації морфогенні структури пересаджують на регенераційне середовищі із зменшеною кількістю вуглеводного компоненту та регуляторів росту (див. табл. 1). Морфогенні структури пересаджують, не порушуючи полярності, зазвичай разом із пиляками у пробірки з середовищем, що застигло у вигляді пласкої поверхні,

або у чашки Петрі. Культивацийні посудини впродовж трьох діб витримують у термостаті, а потім переносять до світлової кімнати, де підтримується температура 24–25 °С і фотоперіод 16 годин, на стелаж з низькою освітленістю (5–10 кЛк).

Утворені зелені рослин-регенеранти нормальної морфології пересаджують для дорощування на безгормональне середовище. Добре розвинені рослини переносять для стимулювання утворення коріння у великі пробірки (20×210 мм) на мінімальне живильне середовище, яке містить половинну концентрацію солей макро- та мікроелементів, зменшену до 20 г/л або 10 г/л кількість сахарози та 2 мг/л НОК, яка сприяє ефективному коренеутворенню (див. табл.1).

Для визначення ефективності регенерації рослин використовують такий показник, як кількість одержаних рослин на 100 культивованих пиляків. Оскільки у культурі пиляків *in vitro* ячменю та інших представників родини *Poaceae* з високою частотою утворюються хлорофілдефектні рослини (рис. 7), в основному альбіноси, підраховують кількість рослин з різним забарвленням.

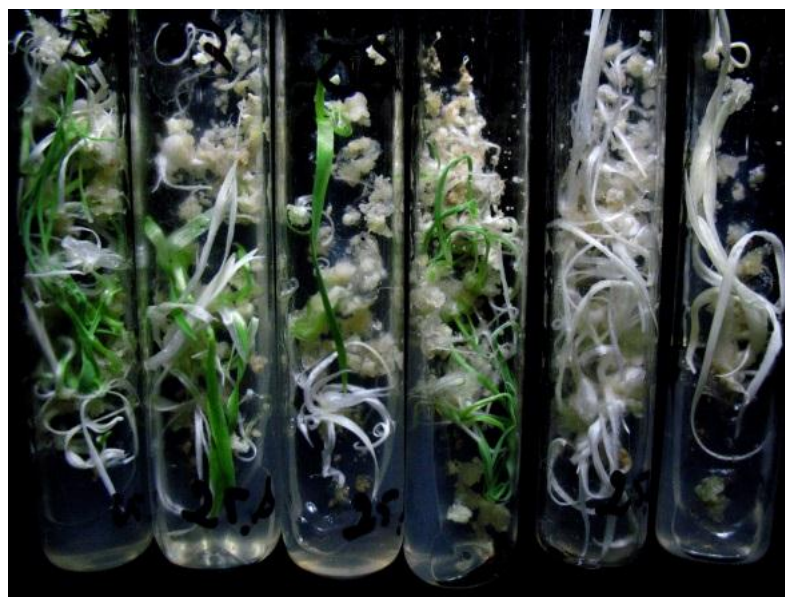


Рисунок 7. Регенерація зелених рослин і рослин-альбіносів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю

Додатковими характеристиками можуть слугувати кількість рослин-регенерантів у перерахунку на 100 морфогенних пиляків та співвідношення зелених та хлорофілдефектних рослин.

3.5 Визначення рівня плоідності рослин-регенерантов і диплоїдизація гаплоїдів

Особливістю культури пиляків *in vitro* ячменю є високий рівень спонтанної диплоїдизації (до 80–90 %) [21], завдяки якій серед регенерантів переважають диплоїдні рослини, що дають насіннєве потомство без обробки диплоїдизуючими речовинами. Встановлено, що подвоєння гаплоїдного набору хромосом відбувається на ранніх етапах спорофітного розвитку мікроспор [60, 61]. Тому рослини, одержані у пиляковій культурі, є саме гомозиготними подвоєними гаплоїдами, а не похідними від диплоїдних тканин пиляків. Також з невеликою частотою можливе утворення міксоплоїдів та тетраплоїдів [37].

Такий високий відсоток диплоїдів дозволяє вилучити із технологічної схеми не лише етап обробки колхіцином, а також досить трудомістку процедуру відбору гаплоїдів за результатами цитологічного аналізу з підрахунку кількості хромосом у соматичних клітинах. Разом з тим рівень спонтанної диплоїдизації може залежати від генотипу донорних рослин і в окремих випадках не перевищувати 65 % [62]. Тому при проведенні досліджень з вивчення закономірностей спонтанної диплоїдизації чи при роботі з особливо цінним матеріалом, наприклад з віддаленими гібридами, може виникнути необхідність у скринінгу ориманих регенерантів щодо рівня їх плоідності.

Слід мати на увазі, що гаплоїди та диплоїди ячменю не розрізняються на стадії пробіркових рослин ні за шириною та довжиною листків, ні за інтенсивністю росту. Відмінності стають чітко видимими лише у фазі виходу в трубку та колосіння. Зокрема, гаплоїди вирізняються дуже високою кустистістю (до 30 пагонів), низькою висотою та дрібним стерильним колоссям.

Визначення рівня плоідності регенерантів проводять шляхом підрахунку кількості хромосом у кінчиках корінців. Найбільш придатними для цитологічного аналізу є корінці, ріст яких індуковано за допомогою НОК на середовищі для коренеутворення. Корінці мають бути у стадії активного росту.

Корінці для аналізу можуть бути отримані у стерильних умовах під час пересадки рослин або у нестерильних після вилучення рослини з пробірки. Відрізають дистальну частину корінця довжиною 0,5–1 см і вміщують у фіксатор Карнуа (льодяна оцтова кислота та 96 % етиловий спирт у співвідношенні 1:3). Добір матеріалу за 16-годинного фотоперіоду (з 6.00 до 22.00) проводять з 8 до 9 години, щоб якомога більше клітин було у метафазі. Корінці фіксують впродовж 6–8 годин, а далі переносять для фарбування у 1–2% розчин ацетокарміну на 12–24 години. Підрахунок хромосом проводять на тимчасових препаратах. Для цього відрізають забарвлений у більш темний колір кінчик корінця, який містить зону росту, і вміщують у краплю 45 %-ої

оцтової кислоти або 0,5 %-го ацетокарміну. Після нетривалого нагрівання над полум'ям спиртівки його роздавлюють під покривним склом для одношарового розподілу клітин.

У соматичних клітинах культурного ячменю міститься 14 доволі великих за розміром хромосом. Тому для підрахунку їх кількості з метою добору гаплоїдів для колхцінування немає необхідності у спеціальних методичних прийомах для поліпшення морфології хромосом. В разі необхідності отримання якісних світлин метафазних пластинок для зменшення довжини хромосом корінці перед фіксацією вміщують у флакон із льодом і витримують у холодильнику впродовж 12–24 годин. Для кращого розподілу хромосом застосовують обробку корінців розчином α -монобромнафталіну впродовж 3 годин. Розчин α -монобромнафталіну готують шляхом додавання 12 крапель реактиву до 50 мл дистильованої води та сапоніну – на кінчику скальпеля. Далі розчин у герметично закритій пляшці треба збовтати впродовж 1 години. Після обробки розчином α -монобромнафталіну корінці промивають водою, переносять у фіксатор Карнуа і витримують впродовж 24 год.

Можна визначати кількість хромосом на препаратах щойно зрізаних корінців без попередньої фіксації, фарбуючи їх при нагріванні над полум'ям спиртівки у 2 %-му розчині ацетокарміну на предметному склі або у тиглі, але якість препаратів буде гіршою. Гаплоїди і диплоїди ячменю добре розрізняються і у анафазі. Для фарбування можна використовувати, окрім карміну, орсеїн та лакмоїд, розчини яких готують розчиняючи 1–2 грами барвника при нагріванні із зворотним холодильником у 45 % оцтовій кислоті [55].

Відомий також метод визначення рівня плоїдності у ячменю за розміром замикаючих клітин продихів [63], але він відпрацьований для рослин, пересаджених у ґрунт. Згідно пропису від листка найбільш розвиненого пагона відрізають сегмент довжиною 2 см, розрізають навпіл і вміщують у киплячий 70 % спирт на 10 хв для екстракції хлорофілу, потім фіксують у фіксаторі Карнуа. Сегмент вміщують у краплю води на предметне скло, накривають покривним склом та вимірюють довжину замикаючих клітин під мікроскопом за допомогою об'єкт-мікрометра за збільшення $\times 500$. Довжина замикаючих клітин продихів варіює у гаплоїдів від 17 до 25, а у диплоїдів – від 20 до 31 одиниць шкали об'єкт-мікрометра, тобто наявне перекивання. Також відзначаються генотипові особливості щодо розміру досліджуваних клітин у гаплоїдів і диплоїдів. Тому ця методика перед використанням має бути пристосована для визначення плоїдності у пробіркових рослин.

Варто зазначити, що найбільш сучасним методом визначення рівня плідності є проточна цитометрія, але цей метод потребує спеціального обладнання [14].

Подвоєння хромосом найчастіше проводять за допомогою колхіцину. Детальний опис цих методик наведено у літературних джерелах з отримання гаплоїдів і ліній подвоєних гаплоїдів за допомогою гаплопродюсера *H. bulbosum* L. [32, 64]. Згідно цих рекомендацій колхіцинуванню піддають пробіркові рослини у фазі двох-трьох листочків з добре розвиненим корінням, яке захищено від дії диплоїдизуючого агента живильним середовищем. Робочий розчин, який містить 0,15 % колхіцину у 4 % водному розчині диметилсульфоксиду (ДМСО), наливають у пробірку так, щоб рослина була повністю у нього занурена. Далі пробірки переносять у мікроанаеростат або використовують вакуумний насос для введення колхіцину методом вакуум-інфільтрації. Повітря викочують до залишкового тиску 76 мм р.ст. Експозиція у вакуумі – 20 хв. Процедуру повторюють тричі, після чого рослини відмивають від колхіцину проточною водою і пересаджують у посудини з ґрунтовою сумішшю. Для стимулювання росту оброблених рослин проводять їх обприскування розчином, який містить ГК₃ (1 мг/л), кінетин (0,5 мг/л), вітамін РР (3 мг/л), впродовж 5–6 діб.

3.6 Пересадка рослин-регенерантів у ґрунт та одержання їхнього насіннєвого потомства

Пробіркові рослини (R₀), що мають добре розвинену кореневу систему, пересаджують у посудини з ґрунтовою сумішшю для дорощування та одержання насіння.

Ґрунтову суміш готують із чорнозему, піску та сухого гною у співвідношенні 3:1:1. Для підвищення тургору рослин-регенерантів та їх життєздатності при перенесенні в умови *ex vitro* у пробірки наливають проточну воду до повного занурення рослин і витримують їх впродовж 3–5 годин. Потім рослини вилучають із пробірок та відмивають коріння від агару. Рослини пересаджують у пластикові стакани ємкістю 400–500 мл із добре зволоженою ґрунтовою сумішшю, зазначають на етикетках номери, накривають скляним чи пластиковим посудом, поліетиленовими пакетами (зручно використовувати канцелярські файли) і вирощують у кліматичній камері або світловій кімнаті за освітленості не менше 20 кЛк та помірної температури (15–17 °С), що сприяє куцтінню. Якщо нічні температури наприкінці липня та у серпні знижуються принаймні до 19–20 °С, рослини можна вирощувати у природних умовах за притінення. Зазначений вище об'єм культуральних посудин є достатнім для отримання насіннєвого потомства

ячменю. Але цей процес буде більш ефективним за пересадки рослин, що добре розкущилися, у пластикові відра ємкістю 5 л (по п'ять рослин у кожне відро). Далі рослини можна вирощувати при більш широкому діапазоні температур в залежності від наявних умов, зокрема впродовж вересня–жовтня у теплицях, а за зниження температури у пристосованих приміщеннях, оснащених лампами, або у кліматичних камерах. Зібране насіння висівають наступного сезону на дослідних ділянках для одержання рослин R_1 .

4 Особливості селекційного процесу за використання експериментальної гаплоїдії

Основними перевагами селекційного процесу, який ґрунтується на використанні експериментальної гаплоїдії, є швидке одержання гомозиготних ліній і, як наслідок, істотне скорочення тривалості та трудомісткості досліджень з визначення їхніх біологічних і господарських ознак у системі селекційних розсадників. Але для реалізації переваг гаплоїдної селекції необхідно одержати у стислі строки достатню кількість насіння.

Насіння, зібране при обмолоті рослин-регенерантів, висівають ручною сівалкою (відстань між рослинами – 5 см, відстань між рядками – 15 см) на дослідній ділянці. Далі проводять фенологічні спостереження та оцінювання рослин покоління R_1 за продуктивністю. Ця процедура фактично аналогічна вивченню ліній, відібраних з гібридних популяцій, що розщеплюються, у селекційному розсаднику першого року за традиційної схеми селекції, але може бути проведена вже через два роки після гібридизації (рис. 8).

Як свідчить досвід наших багаторічних досліджень, в разі зав'язування на рослинах R_0 від 80 до 100 зерен з рослин R_1 може бути одержана достатня кількість насіння (від 250 до 600 г) для випробування кращих ДН-ліній (потомство R_2) одразу у контрольному розсаднику, тобто на третій рік після гібридизації. Натомість низька насіннева продуктивність рослин-регенерантів, яка може бути пов'язана із міксполідією або з несприятливими умовами вирощування, навпаки, призводить до відтермінування строків оцінки ліній у системі селекційних розсадників і втрати часових переваг гаплоїдної селекції.

Як відомо, характерною особливістю подвоєних гаплоїдів є їхня цілковита гомозиготність, що має наслідком відсутність внутрішньолійної мінливості та константність при розмноженні.

Відсутність домінування в усіх локусах дозволяє легко виявляти у ДГ-ліній, створених на основі гібридів, поряд з домінантними і рецесивні ознаки. З походженням андрогенних гаплоїдів з мікроспор, геном яких формується на основі генетичної рекомбінації у мейозі, пов'язана специфічна міжлінійна мінливість у популяціях ліній подвоєних гаплоїдів, які походять від певної

гібридної комбінації – розщеплення за усіма ознаками як 1:1 замість 3:1 у гібридному поколінні F_2 [65]. Це дозволяє використовувати експериментальну гаплоїдію як ефективний метод одержання вихідного матеріалу у спеціальних селекційних програмах, особливо спрямованих на добір генотипів з ознаками, що мають простий генетичний контроль [66].

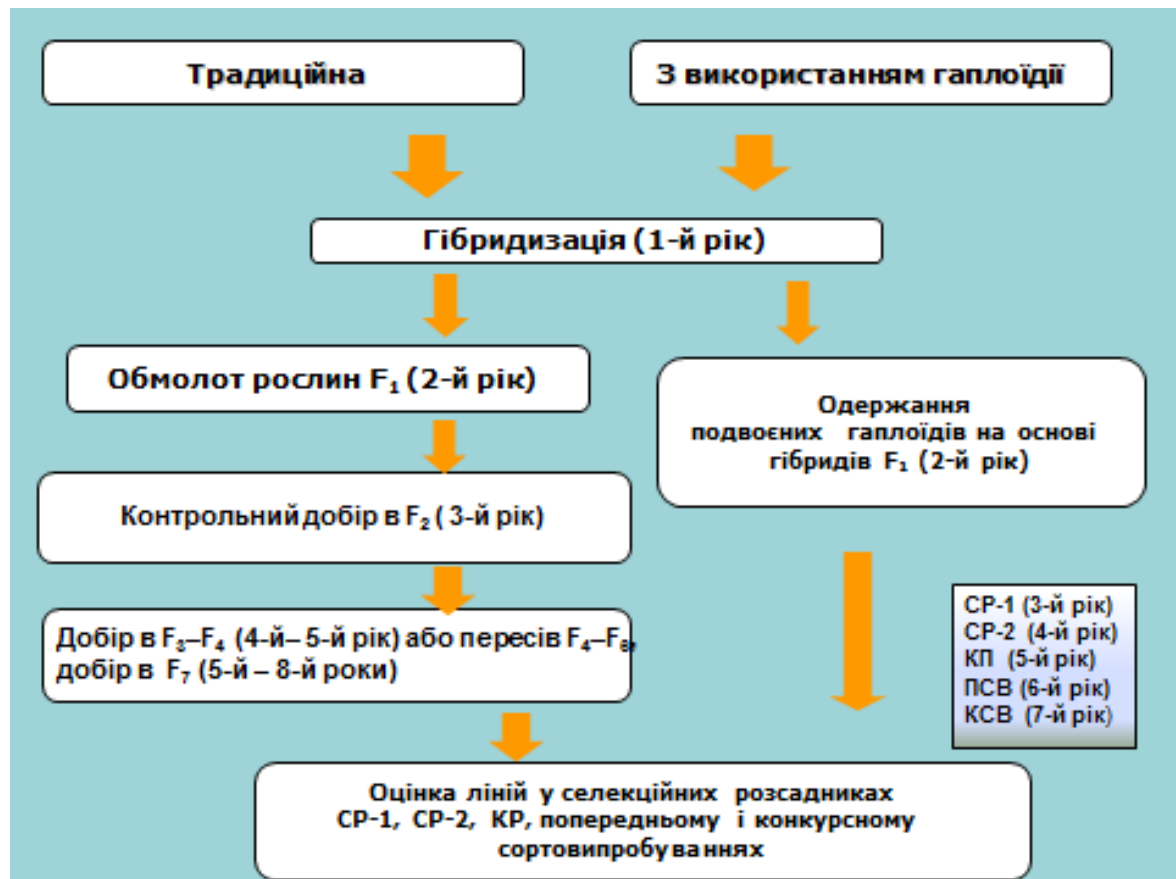


Рисунок 8. Схема селекційного процесу за використання традиційних методів добору та експериментальної гаплоїдії (CP-1, CP-2 – селекційні розсадники першого і другого року; ПСВ – попереднє сортовипробування; КСВ – конкурсне сортовипробування).

Та й у селекції на кількісні ознаки, до яких належить переважна більшість ознак продуктивності та якості, швидке одержання гомозиготних рекомбінантних ліній дозволяє істотно підвищити ефективність добору цінних генотипів [67].

Особливе значення має експериментальна гаплоїдія для створення матеріалу для молекулярно-генетичних досліджень, зокрема, для валідації ДНК-маркерів та картування генів [68]. Для проведення таких досліджень добирають сорти з контрастними ознаками, одержують гібриди F_1 і на їхній

основі основі – популяції ліній подвоєних гаплоїдів (бажано 50–100 шт.). Далі проводять дослідження фенотипової мінливості певної ознаки у ліній у порівнянні з батьківськими сортами та оцінювання молекулярно-генетичного поліморфізму за певними маркерними локусами. Співставлення даних з фенотипування і генотипування дозволяє виявити ефективні маркери для подальшого застосування у селекційному процесі.

Варто зазначити, що подвоєні гаплоїди є найбільш зручним матеріалом для маркер-допоміжної селекції, і поєднання цих двох методичних підходів у одному технологічному процесі відповідає найбільш сучасним тенденціям селекційної науки і практики [69].

5 Планування експериментів з культивування пиляків *in vitro* та статистичний аналіз результатів досліджень

У разі масового одержання подвоєних гаплоїдів на основі гібридного матеріалу для селекції чи генетичних досліджень у гібридному розсаднику добирають і закладають на попередню обробку максимально можливу кількість колосся, яке містить пиляки з мікроспорами у пізній або середній вакуолізованій фазі. Число висаджених на живильне середовище пиляків залежить від збереженості мікроспорами оптимальної фази розвитку після попередньої обробки, кадрового складу та технічних можливостей лабораторії.

Натомість експерименти, які мають за мету вивчення впливу певних чинників на ефективність отримання андрогенних гаплоїдів та оптимізацію технології, потребують розробки відповідних схем, добору спеціального рослинного матеріалу та виконання заздалегідь визначених обсягів робіт.

Оскільки обов'язково має бути дотриманий принцип єдиної відмінності, дослідження проводять у якомога стислі строки за використання рослинного матеріалу кожного генотипу, відібраного впродовж одного–двох днів. Дослід з великою кількістю варіантів, якщо немає можливості висадити на живильне середовище усі пиляки згідно схеми впродовж одного робочого дня, варто розбити на окремі блоки (повторення), які включають усі варіанти і контроль, і висадити пиляки впродовж двох–трьох днів. Великі часові інтервали між висаджуванням контрольного і дослідного варіантів одного генотипу за використання колосся різних ярусів, відібраного у різні строки, особливо за вирощування донорних рослин у неконтрольованих умовах, може призвести до отримання неспівставних результатів дослідження.

Як було зазначено у розділі 3.4, основними показниками, що характеризують перебіг процесів індукції та регенерації у культурі пиляків *in vitro*, є кількість морфогенних пиляків від загальної кількості культивованих пиляків у відсотках та кількість рослин-регенерантів на 100 культивованих

пиляків. Іноді використовують такий показник, як кількість морфогенних пиляків та рослин-регенерантів від кількості пиляків, вміщених в одну культуральну посудину, яка розглядається як повторність [70].

Для оцінювання істотності різниці між дослідними варіантами застосовують методи варіаційної статистики (t-критерій Ст'юдента або ф-критерій Фишера) та дисперсійний аналіз якісних (альтернативних) ознак за Н.А. Плохінським [71] (відповідно алгоритми 12, 22 та 25). Можна скористатися програмою AgCStat [72] за посиланням <http://vniioh.ru/nadstrojka-k-excel-dlya-statisticheskoy-ocenki-i-analiza-rezultatov-polevyx-i-laboratornyx-opytov/>.

Розмір вибірки обраховують, виходячи з припустимої точності визначення показників для певного дослідження [71] (алгоритм 29), зокрема, зважаючи на біологічну ефективність технології отримання андрогенних гаплоїдів. Розрахунки показують, що в разі обрання значущої різниці між варіантами на рівні 5 %, досить вибірки з 400-500 пиляків. За дуже низьких показників індукції та регенерації обсяг вибірки для виявлення істотності різниці між варіантами може бути збільшений до 1000 пиляків.

Як модельні генотипи для вивчення генетичних основ експериментального андрогенезу *in vitro* та удосконалення методик рекомендовано використовувати створену нами лінію DN00-126 та сорт ярого ячменю Модерн, яким притаманна висока здатність до утворення андрогенних структур (переважно ембріоїдів та ембріогенного калюсу) і зелених рослин-регенерантів; сорти Екзотик та CDC Alamo з високою частотою утворення андрогенних структур (переважно калюсу) та низькою частотою регенерації зелених рослин, а також сорти Фенікс та Mebere, які характеризуються низьким значенням обох зазначених вище показників. Останній генотип утворює велику кількість хлорофілдефектних рослин-регенерантів, що робить його придатним для експериментів з розробки підходів до подолання цієї проблеми. Зазначений рослинний матеріал можна отримати у Національному центрі генетичних ресурсів рослин України (м. Харків).

6 Первина документація, позначення ліній подвоєних гаплоїдів

Як відомо, необхідною умовою успішного проведення будь-якого експерименту є точна фіксація первинних даних. Оскільки технологією отримання андрогенних гаплоїдів передбачено виконання низки етапів, доцільним є ведення кількох журналів первинної документації, у яких відображено черговість виконання робіт. Перший журнал – «Вирощування вихідного матеріалу та розмноження ліній подвоєних гаплоїдів», у якому відмічено дату сівби, номери ділянок і генотипи, результати фенологічних

спостережень, включно з датою початку добору колосся, характеристику гідротермічного режиму у період проходження рослинами певних фаз онтогенезу. За вирощування рослин у камерах штучного клімату зазначають температуру, фотоперіод, освітленість. Зручно мати окремий журнал – «Добір і попередня обробка матеріалу», у якому фіксується дата добору колосся, режим і спосіб попередньої обробки, кількість зрізаних пагонів, дата використання колосся для одержання асептичної культури пиляків (табл. 2).

Відомості щодо кількості висаджених на середовище пиляків заносять у журнал № 3 «Культура пиляків *in vitro*» (табл. 3).

Таблиця 2. Приклад заповнення журналу № 2 «Добір і попередня обробка матеріалу»

Рік проведення досліджень	2019				
Дата добору колосся	№ ділянки	Генотип	Режим і спосіб попередньої обробки	Кількість зрізаних пагонів	Дата висаджування пиляків на живильне середовище
25.05.19	15	DH00-126	4 °C, пагони у воді, без світла	28	1.06.19

Таблиця 3. Приклад заповнення журналу № 3 «Культура пиляків *in vitro*»

Рік проведення досліджень	2019							
Дата висаджування пиляків на живильне середовище, № ділянки, генотип, варіант дослідження	№ пробірки (№ колоса)	Кількість культивованих пиляків, шт.	Дата спостереження, кількість морфогенних пиляків, шт.				Кількість рослин-регенерантів, шт.	
			24.06	1.07	8.07	18.07	зелених	альбіносів
1.06.18 Дел. № 5, DH00-126 середовище NMSмод.2 (контроль)	1	45	2	7	14	22	14	4
	2	41	3	8	15	20	15	9
Разом		86				42	29	13

Аби чітко розрізняти дослідні варіанти і не помилитися при пересадках, варто застосовувати навскрізну нумерацію пробірок (колосся) впродовж одного року. На пробірці позначають порядковий номер, номер ділянки та дату. В окремі графи журналу записують дату, генотип, варіант досліджу, кількість висаджених пиляків кожного колосу. Результати спостережень, починаючи з 20-ї доби від інокуляції пиляків на живильне середовище, заносять в окремі графи відповідно до дати спостереження, що дозволяє фіксувати динаміку індукції морфогенних структур. Передбачено окремий рядок, куди після підрахунку, записують загальне число висаджених на середовище пиляків певного варіанту досліджу, а також кількість морфогенних пиляків, яку визначають за даними останнього перед пересадкою спостереження.

До таблиці включено графу, в якій зазначають загальну кількість отриманих рослин-регенерантів. Останні дані переносять після закінчення експерименту з журналу «Пересадки, отримання рослин-регенерантів» (табл. 4).

Таблиця 4. Приклад заповнення журналу № 4 «Пересадки, отримання рослин-регенерантів»

Рік проведення досліджень	2019				
Дата пересадки на живильне середовище для регенерації, № ділянки (генотип)	№ пересадки	№ пробірки (№ колоса).	Характеристика андрогенних структур	Кількість рослин-регенерантів, шт.	Дата пересадки рослин на середовище для коренотворення, (№ пробірки) або у ґрунт
<u>20.07</u> дел. № 5, DH00-126	1	15	10 ембріодів, 23 глобули, 5 калюсів	2 зел, 3 альб., 12 зел. Σ14 зел. 3 альб.	<u>10.08</u> 324, 324, 325
<u>10.08</u> дел. № 5, DH00-126	324	15	1 зел. без коріння.	1 зел. рослина, корені	5.09 у ґрунт
<u>10.08</u> дел. № 5, DH00-126	325	15	1 зел. без коріння.	1 зел. рослина, корені	10.09 у ґрунт

Рекомендація відносно заведення окремого журналу для документування етапу регенерації рослин ґрунтуються на особливостях пересадки морфогенних

структур на регенераційне середовище. Зокрема, в разі високої частоти індукції калюс та ембріоди з однієї первинної пробірки пересаджують у кілька пробірок з регенераційним середовищем.

Важливо розрізнити рослини, які одержані з пиляків одного колосу, але у різних пробірках на регенераційному середовищі, адже у цьому випадку істотно зростає вірогідність того, що вони є генетично різноманітними рекомбінантами, а не клонами, що походять із ембріогенного калюсу з високою проліферативною активністю, утвореного з одної мікроспори. Окрім цього, у первинних пробірках після пересадки, зазвичай залишаються дрібніші глобулярні структури, які продовжують ріст і розвиток. Через 2–3 тижні вони потребують пересадки на регенераційне середовище. Також більш точним стає підрахунок рослин-регенерантів, одержаних з пиляків одного колосу.

Отже, у назві створеної лінії (DH – від англ. doubled haploid, подвоєний гаплоїд) зазначається рік, номер первинної пробірки, що відображає її походження з мікроспор окремого колосу певного генотипу. До назви також включено номер пересадки, щоб розрізнити лінії, отримані за культивування пиляків одного колосу, наприклад ДГ19-15(324). Це означає: лінію одержано у 2019 році з пиляків, вилучених з колосу № 15 за пересадки морфогенних структур у пробірку № 324.

Бажано мати окремий журнал «Вирощування рослин-регенерантів R_0 та аналіз їх насіннєвого потомства» для запису дати і кількості пересаджених у ґрунт рослин, характеристики продуктивності рослин (кількість зерен чи стерильність через гаплоїдний статус). У цей журнал заносять дані аналізу елементів продуктивності рослин R_1 і урожаю зерна з ділянки, а також фіксують результати випробування ліній подвоєних гаплоїдів у селекційному розсаднику другого року, контрольному розсаднику, попередньому та конкурсному сортовипробуванні.

Післямова

Культура пиляків *in vitro* є універсальним методом одержання гаплоїдів і константних гомозиготних ліній багатьох сільськогосподарських культур, включно з ячменем. Застосування експериментальної гаплоїдії дозволяє не лише істотно зменшити строки створення нових сортів, але й більш раціонально поєднати сучасні молекулярно-генетичні і класичні селекційні методи. Беззаперечну цінність мають популяції ліній подвоєних гаплоїдів для підвищення ефективності досліджень у галузях спеціальної генетики, зокрема, для встановлення ефектів генів, QTL-аналізу, генетичного маркерування і картування тощо.

Сучасний рівень знань і методичних розробок у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю дійсно дозволяє здійснювати масове одержання гаплоїдів. У деяких країнах далекого і ближнього зарубіжжя технології гаплоїдної індукції вже стали невід'ємною складовою частиною селекційних програм. Але попри вагомі успіхи у розробці теоретичних і методичних основ експериментального андрогенезу *in vitro* залишається багато проблемних питань, які потребують дослідження з використанням нових підходів. Запропонована технологія може слугувати основою для проведення науково-дослідних робіт, спрямованих на розробку більш досконалих технологічних схем та їх впровадження для підвищення ефективності селекції ячменю в Україні.

Перелк літературних джерел

1. Seguí-Simarro J.M., Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol. Plant.* 2008. Vol. 134, N 1. P. 1–12.
 2. Gilles L.M., Martinant J.P., Rogowsky P.M., Widiez T. Haploid induction in plants. *Curr. Biol.* 2017. Vol. 27, N 20. P. 1095–1097.
 3. Dunwell J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal.* 2010. Vol. 8, No 4. P. 377–424.
 4. Blakeslee A., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D. A haploid mutant in Jimson weed "*Datura stramonium*". *Science*, 1922. Vol. 55. P. 646–647.
 5. Хохлов С.С., Гришина Е.В., Зайцева М.И. и др." Галлоидия у покрытосеменных растений, часть I, Саратов, Изд-во СГУ, 1970, 137 с.
 6. Guha S., Maheshwari S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*. 1964. Vol. 204. P. 497–498.
 7. Prakash J, Giles K. Induction and growth of androgenic haploids. *Int. Rev. Cytol.* 1987. Vol. 107. P. 273–292.
 8. Hoveida Z.S., Abdollahi M.R, Mirzaie-Asl A., Moosavi S.S., Seguí-Simarro J.M. Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017. Vol. 130, N 2. P. 369–378.
 9. Kästner U., Kittler J., Marthe F. Comparison of in vitro haploid induction in balm (*Melissa officinalis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016. Vol. 126, N, 3. P. 561–566.
 10. Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970. Vol. 225. P. 874-875.
 11. Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: *Doubled haploid production in crop plants. A Manual.* Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko, I. (eds.). Kluwer: Dordrecht, 2003: 15–19.
 12. Watts A., Kumar V., Raipuria R.K., Bhattacharya R.C. In vivo haploid production in crop plants: methods and challenges. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2018. Vol. 36, N 5–6. P. 685–694.
 13. Сатарова Т.Н., Черчель В.Ю., Черенков А.В. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии (монография). Днепропетровск: Новая идеология, 2013. 552 с.
 14. Devaux P., Kasha K.J. Overview of barley doubled haploid production. *Advances in haploid production in high plants* /Ad. A. Touraev, B.P. Forster, S.J. Mohan. Springer Science+Business Media, 2009. P. 47–64.
-

15. Clapham D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 1973. Vol. 69, N 2. P. 142–155.
 16. Генетика культурных растений: Зерновые культуры. / Под ред. В.Д. Кобылянского и Т.С. Фадеевой. Л.: Агропромиздат, 1986. 264 с.
 17. Maraschin S. F., De Periester W., Spaink H.P., Wang M. Androgenic switch: an example of plant embryo genesis from the male genotype perspective. *Journal of Experimental botany*. 2005. Vol. 56. P. 1711–1726.
 18. Sunderland N., Huang B. Barley anther culture: the switch of programme and albinism. *Hereditas*. 1985. Supl. 3. P. 27–40.
 19. Kasha K. J., Simion E., Oro R, Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley. *Euphytica*. 2001. Vol. 120. P.
 20. Shim Y. S., Kasha K. J., Simion E., Letarte J. The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma*. 2006. Vol. 228. P. 79–86.
 21. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production of doubled haploids in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rept.* 1989. Vol. 8, N 2. P. 110–118.
 22. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media. *Plant Breed.* 1987. V. 99, N 2. P. 161–171.
 23. Finnie S.J., Powell W., Dyer A.F. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant breed.* 1989. Vol. 103, N 2. P. 110–118.
 24. Manninen O.M. Association between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2000. Vol. 100. P. 57–62.
 25. Cistué L, Valles MP, Echavarri B, Sanzand JM, Castillo A. Barley anther culture. In: Doubled haploid production in crop plants. A Manual. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. (eds.) Kluwer: Dordrecht, 2003. P. 26–34.
 26. Muñoz-Amatriaín M., Svensson J. T., Castillo A. M., Close T. J., Vallés M. P. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct. Integr. Genomics*. 2009. Vol. 9. P. 311–323.
 27. Zarejko I. Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Doubled haploid production in crop plants. A Manual. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. (eds.) Kluwer: Dordrecht, 2003. P. 35–41.
 28. Makowska K, Kałużniak M, Oleszczuk S, Zimny J, Czaplicki A, Konieczny R. Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017. Vol. 131, N 2. P. 247–257.
-

29. Башабаева Б.М., Исмагул А.Ж., Абугалиева А.И., Алимгазинова Б.Ш., Сариев Б.С. Культура изолированных микроспор в создании генетически однородных и стабильных дигаплоидных генотипов ячменя. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013. №1. С. 24–27.
30. Asakavičiute R., Pašakinskiene I. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley cultivars. *Biologie*. 2006. N. 4. P. 37–40.
31. Germanà M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011. Vol. 104, N 3. P. 283–300.
32. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А., Наволоцкий В.Д., Шеремет А.М. Использование гаплоидов для интенсификации процесса получения исходного материала в селекции ячменя. *Доклады ВАСХНИЛ*. 1983. № 5. С. 9–11.
33. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
34. Манзюк В.Т., Наумова Л.М. Создание исходного материала в селекции ячменя методом бульбозум. *Сельскохозяйственная биотехнология*. 1987. № 7. С. 3–7.
35. Білінська О.В. Становлення та розвиток біотехнологічних досліджень в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Теоретичні дослідження і практичні досягнення Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН: історія та сьогодення (1908–2018 рр.) [Монографія] за ред. Кириченка / НААН, Інститут рослинництва імені В. Я. Юр'єва. Харків, 2018. С. 131–147.
36. Манзюк В.Т., Наумова Л.М., Білінська О.В. Нові методи в селекції ярого ячменю. *Селекція і насінництвою* К.: Урожай, 1992. Вип. 72. С. 26-29.
37. 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.
38. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*₂) 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.
39. Білінська О. В., Дульнєв П. Г. Ефективність отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* на основі гібридного матеріалу: порівняння базової та удосконаленої технологій. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. праць / НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. товариство генетиків і селекціонерів ім.

- М. І. Вавилова / редкол. : В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. К.: Логос, 2019. Т. 25. С. 178–183.
40. Bilynska O.V. Influence of spike pretreatment at a low temperature on the efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020. Vol. 30, N 1. P. 68–76.
41. Білінська О.В., Дульнєв П.Г. Природні та хімічно модифіковані крохмалі у складі живильних середовищ для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Хімія, екологія, освіта: IV Міжнародна науково-практична конференція, Полтава: ПДАА (21–22 травня 2020 р.). С. 32–37.
42. Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.* 2005. Vol. 89. P. 1870–1878.
43. Datta S.K. Plant regeneration by pollen embryogenesis from cultured whole spikes of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 1987. Vol. 74. P. 121–124.
44. Magnard J.L., Le Deunff E., Domenech J. et al. Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant mol. biol.* 2000. Vol. 44. P. 559–574.
45. Круглова Н.Н. Унифікація термінології при розробці інноваційної біотехнології андроклінної гаплоїдії *in vitro*: постановка проблеми. *Фізіологія і біохімія культ. рослин*. 2009. Т. 41, № 6. С. 475–486.
46. Finnie S. J., Foster B. P., Chalmers K. J., Dyer A. F., Waugh R., and Powell W. Genetic stability of microspore-derived doubled haploids of barley: a cytological, biochemical, and molecular study. *Genome*. 1991. Vol. 34, N 6. P. 923–928.
47. Smith R. Plant tissue culture. Techniques and experiments. Third edition. Oxford: Elsevier, 2013. 188 p.
48. Бєлінська Е. В. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2005. Т. 37, № 5. С. 436–442.
49. Патент на винахід 113261, Україна, А01Н 4/00, С12Н 5/02 (2006.1). Спосіб попередньої обробки рослинного матеріалу для отримання гаплоїдів ячменю ярого у культурі пиляків *in vitro* / О. В. Білінська, заявник і патентовласник Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. а 2016 00611; заявл. 21.05.2016. Опубл. 26.12.2016. Бюл. № 14.
50. Деклараційний патент на винахід 52031, Україна, МПК 7, С08В31/02, А01Н57/00, А01Н59/00, А01С1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів / П. Г. Дульнєв, С. І. Кондратенко, Т. В. Чернишенко, В. П. Мірошніченко, Т. В. Івченко, С. А. Гончарова Опубл. 16.12.02, Бюл. № 12.
-

- 51.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.
 - 52.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.
 - 53.Білінська О. В., Тимчук С. М., Дербізова О. Ю. Ефективність отримання гаплоїдів ярого ячменю методом культури пиляків *in vitro* при використанні як гелеутворювачів живильних середовищ зернових крохмалів гороху з різним вмістом амілози. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наук. праць. К.: Логос, 2012. Т. 4. С. 426–431.
 - 54.Foroughi-Wehr B., Mix G. In vitro response of *Hordeum vulgare* anthers cultured from plants grown under different environments. *Environ. And Exp. Bot.* 1979. Vol. 19, N 14. P. 303–309.
 - 55.Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд. перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
 - 56.Huang B., Sunderland N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. 1982. *Ann. Bot.* Vol. 49. P. 77–88.
 - 57.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.
 - 58.Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
 - 59.Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум К. Избранные методы исследования крахмала. М.: Пищевая промышленность, 1975. 183 с.
 - 60.Chen C.C, Howarth M.J., Peterson R.L., Kasha K.J. Ultrastructure of androgenic microspores of barley during the early stages of anther culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 1984. Vol. 26. P. 484–491.
 - 61.Shim Y. S, Kasha K. J., Simion E., Letarte J.The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma.* 2006. Vol. 228. P. 79–86.
 - 62.Білінська О.В., Анциферова О.В., Козаченко М.Р. Застосування методу культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю на безостістю Сучасні технології селекційного процесу сільськогосподарських культур: Міжнародний симпозіум (7–9 липня 2004 р.) .Харків: Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, 2004. С. 149–150.
 - 63.Borrino E.M., Powell W. Stomatal guard cell length as an indicator in microspore-derived plants of barley. *Genome.* 1987. Vol. P. 158–160.
-

64. Получение гаплоидов с помощью гаплопродюсеров. Методические рекомендации. Составители: Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Одесса: ВСГИ, 1988. 28 с.
65. Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant. Breed. Rev.* 2005. Vol. 25. P. 57–88.
66. Білінська О.В. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу ячменю ярого у спеціальних селекційних програмах. Селекційно-генетична наука і освіта: Міжнар. наук. конф. Умань, 16–18 березня 2016 р.: тези доп. Умань: Уманський національний університет садівництва, 2016. С. 37–42.
67. Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33, N 6. P. 812–829.
68. Tuveson S., Dayteg C., Hagberg P., Manninen O., Tanhuanpaa P., Tenhola-Roininen T., Kiviharju E., Weyen J., Forster J., Schondelmaier J., Lafferty J., Marn M., Fleck A. Molecular Markers and Doubled Haploids in European Plant Breeding. *Euphytica.* 2007. Vol. 158. P. 305–312.
69. Stewart C., Neal Jr. Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications / Ed. C. Stewart. Second edition. New Jersey: Welly & Sons Inc., 2016. 406 p.
70. Munoz-Amatrian M., Svensson J. T., Castillo T.J., Close T.J., Vallés M.P. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct. Integr. Genomics.* 2009. Vol.9, N 3. 311–323.
71. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. М.: Изд. Московского университета, 1964. 79 с.
72. Гончар-Зайкин П.П., Чертов В.Г. Надстройка к Excel для статистической оценки и анализа результатов полевых и лабораторных опытов. Рациональное природопользование и сельскохозяйственное производство в южных регионах российской федерации. Сб. трудов научно-практ. конференции «Разработка адаптивных систем природоохранных технологий производства сельскохозяйственной продукции в аридных районах России» (Рассвет, 13–14 мая 2003 г.). М.: Современные тетради, 2003. С. 559–565.
-

Науково-методичне видання

Білинська Олена Володимирівна

**Одержання подвоєних гаплоїдів ярого ячменю методом
культури пиляків *in vitro***

Методичні рекомендації

Підписано до друку 31.03.2021 р. Формат 60x84x1/16

Папір офсетний. Друк офсетний.

Наклад 10 прим. Ум. друк. арк. 1,9. Зам. № 243/2 Віддруковано з оригінал-макету у
«Центрі цифрової поліграфії» м. Харків, пр. Науки, 7, тел. 702-13-88

e-mail: nauki007@gmail.com