

Українська академія аграрних наук
Південний біотехнологічний центр в рослинництві

**Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці
в культурі пиляків**

Методичні рекомендації

Одеса 2008

Друкується за рішенням вченої ради Південного біотехнологічного центру
в рослинництві УААН (протокол № 14 від 12.12.2008 р.)

Автори:

доктор біологічних наук Ігнатова С.О.,
молодший науковий співробітник Жосонар М.В.
молодший науковий співробітник Лобанова К.І.
науковий співробітник Шестопа О.Л.

**Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі
пиляків:** Методичні рекомендації / Ігнатова С.О., Жосонар М.В.,
Лобанова К.І. та інш.; Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. –
Одеса, 2008. – 12 с.

Обґрунтовано принципи і представлено методичні розробки з
одержання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці з використанням культури
пиляків. Методичні рекомендації розраховані на спеціалістів в області
біотехнології, генетики і селекції.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП	3
1. ОПИС МЕТОДУ	4
2. ОДЕРЖАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	
В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>	5
2.1. Умови вирощування донорних рослин м'якої пшениці	5
2.2. Добір матеріалу озимої м'якої пшениці в культуру пиляків	
<i>in vitro</i>	6
2.3. Попередня обробка пагонів донорних рослин	6
2.4. Поверхнева стерилізація матеріалу	6
2.5. Виділення пиляків м'якої пшениці та їх введення в культуру	
<i>in vitro</i>	6
2.6. Тестування перших етапів морфогенезу мікроспор за	
культивування пиляків в умовах <i>in vitro</i>	7
2.7. Умови культивування новоутворень та живильні середовища	
для регенерації рослин	7
2.8. Дорошування та яровизація отриманих рослин-регенерантів	
озимої м'якої пшениці. Отримання насіннєвого потомства	8
ДОДАТОК 1. Матеріали та обладнання	9
ДОДАТОК 2. Склад живильних середовищ	10
ЛІТЕРАТУРА	11

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АБК – абсцизова кислота
 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
 ІОК – β -індолил-3-оцтова кислота
 НОК – α -нафтилоцтова кислота
 ІМК – 3-індолилмасляна кислота
 190-2 – живильне середовище (Wang, Hu, 1983)
 MS – живильне середовище (Murashige, Skoog, 1962)
 ЕКК – ембріонально-клітинні комплекси
 ФПЧ – фотоперіодична чутливість
 ТЯ – тривалість яровизації

ВСТУП

Розробка біотехнологічних методів з метою використання їх у теоретичних і прикладних дослідженнях та практичній роботі у напрямку створення вихідного матеріалу і прискорення окремих етапів селекції головних хлібних злаків у теперішній час набуває особливого значення. Серед них розробки, спрямовані на збільшення ефективності методів отримання гомозиготних ліній з гаплоїдів у злаків, розвиваються найбільш активно. Гаплоїдія – явище виникнення особин із гаметиною кількістю хромосом. Гаплоїди рослин виникають із незапліднених редукованих статевих або соматичних клітин. Причин природного зменшення рівня хромосом до гаплоїдного у рослин може бути декілька: внаслідок втрати їх при анеуплоїдії, елімінації хромосом у міжвидових гібридів, а також внаслідок розвитку рослинної особини без запліднення яйцеклітин, або синергід, іноді й антипод, із гаплоїдним числом хромосом материнської рослини (Лаптев, 1984). Також гаплоїди можна отримати різними шляхами в умовах *in vitro*: андрогенезу (андроклінії) в культурі пиляків і мікроспор, гіногенезу за культивування незапліднених насінневих зачатків, гаплопродукцією серного методу.

Для злакових культур, і зокрема м'якої пшениці, біотехнологія одержання гомозиготного матеріалу з мікроспор є найбільш розповсюдженою. Культура пиляків пшениці привертає увагу дослідників простотою виконання і дозволяє одержати протягом одного покоління генетично однорідний і стабільний селекційний матеріал, відкриває можливість отримання широкого спектру константних рекомбінантів із гібридів перших поколінь (Луцькянук, 1985; Махновська, 1997; Ігнатова, 2004). Такий шлях селекції, з використанням культури пиляків *in vitro*, приводить до значного зменшення обсягу популяцій та скороченню площ посівних ділянок цього злаку. Гаплоїди представляють інтерес ще й тому, що на їх рівні у рослин легше виявити рецесивні гени. В культурі пиляків і мікроспор серед регенерантів також можливе одержання анеуплоїдів, поліплоїдів, мікоплоїдів, що служать важливим матеріалом для різних генетичних досліджень (Тоцький, 2002; Тырнов, 2005).

У теперішній час ефективність культури пиляків ярої пшениці знаходиться на досить високому рівні у порівнянні з традиційними методами селекції, які використовуються для одержання лінійного матеріалу пшениці. Проте, при роботі з озимими формами м'якої пшениці проявляється висока генотипоспецифічність за чутливістю до андрогенезу *in vitro*, що обумовлює поки ще низький вихід подвоєних гаплоїдів. Основними лімітуючими факторами ефективності гаплопродукційного процесу є:

- генотип донорної рослини;
 - низький рівень компетентних мікроспор у пиляку і низький рівень ембріодогенезу;
 - високий рівень появи альбіносних рослин.
- Факторами, що впливають на цей процес є:
- фаза розвитку мікроспор у пиляку;
 - тип попередньої обробки донорного матеріалу;

- компонентний склад живильного середовища, регулятори росту рослин, густина висадки пиляків (мікроспор) на живильне середовище;

- умови вирощування (сезонність, інтенсивність освітлення, тривалість світлового дня, температурний режим), що забезпечують фізіологічний стан донорних рослин;

- умови культивування пиляків і новоутворень.

Виходячи з цього, вдосконалення окремих етапів цієї перспективної біотехнології, представляється можливим і має науковий та практичний інтерес.

1. ОПИС МЕТОДУ

В основі біотехнології отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків лежить процес андрогенезу (андроклінії) *in vitro*, оснований на формуванні гаплоїдних рослин-регенерантів із новоутворень, які розвиваються з морфогенних мікроспор за культивування пиляків на штучному живильному середовищі в умовах *in vitro*. Підвищення ефективності даної біотехнології досягається шляхом залученням форм із слабкою фотоперіодичною чутливістю (ФПЧ) та нетривалим періодом «сходи-вакуолізована мікроспора»; добору донорного матеріалу в оптимальному фізіологічному стані; проведення попередньої холодової обробки зрізаних пагонів: при $+2^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$ у темряві протягом 3-5 діб у водному розчині абсцизової кислоти (АБК) (для генотипів озимої м'якої пшениці у концентрації 0,1 мг/л і 0,5 мг/л – для ярих генотипів); додання у живильне середовище MS для регенерації 0,25 мг/л АБК або гіберелової кислоти (0,5 мг/л), яблучної кислоти (25 мг/л) та розчинну крохмалю (1 мг/л), за температури культивування $+9^{\circ}\text{C} - +12^{\circ}\text{C}$ та 16-годинного фотоперіоду. Застосування даних прийомів сприяло збільшенню кількості зелених рослин-регенерантів із морфогенних калусів у 3-5 разів.

Одержані рослини-регенеранти пересаджують у ґрунт, озимі форми перед тим яровизують (40-60 діб при $+2^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$; 12 годинний фотоперіод) та дорошують в умовах штучного клімату.

2. ОДЕРЖАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

Роботу із культури пиляків пшениці проводили за загальноприйнятою схемою (Paris L., Дьячук Т. И.), (Рис. 1).

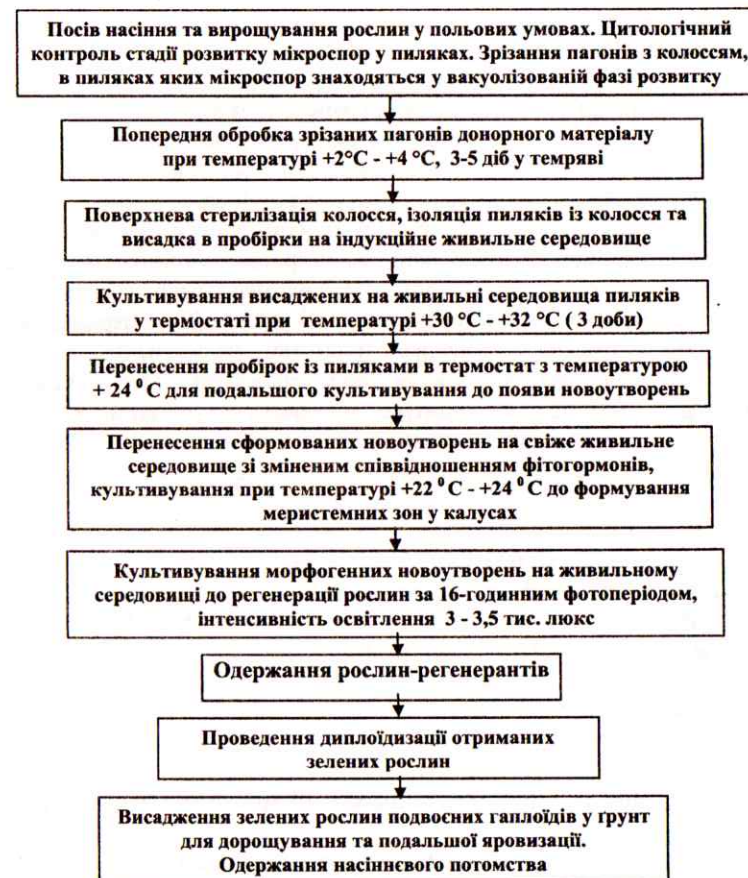


Рис. 1. Схема етапів роботи з культурою пиляків *in vitro* м'якої пшениці

2.1. Умови вирощування донорних рослин м'якої пшениці

Сприятливі кліматичні умови вирощування рослин *in vivo* забезпечують оптимальний фізіологічний стан донорних рослин, що, в свою чергу, визначає результативність методу культури пиляків пшениці в умовах *in vitro*. Для досягнення високого виходу рослин-регенерантів у культурі пиляків озимої м'якої пшениці є необхідним дотримання оптимальних строків посіву донорного матеріалу в польових умовах, що прийняті у конкретному регіоні вирощування.

Донорні рослини можливо вирощувати у камері штучного клімату. В цьому випадку для озимої пшениці проводять яровизацію паростків при температурі +2 °С, 16-годинному фотоперіоді протягом 30-60 діб залежно від потреби у тривалості яровизації генотипу. Умови вирощування рослин у камері штучного клімату: нічна температура +16 °С, денна +20 °С – +22 °С, інтенсивність освітлення – 18-20 тис. люкс лампами «ДРИ-2000» при 16-годинному фотоперіоді.

2.2. Добір матеріалу озимої м'якої пшениці в культуру пиляків *in vitro*

Визначено, що генотипи, які характеризуються слабкою ФПЧ та потребою у нетривалому періоді яровизації (Жосонарь, 2004) і нетривалим періодом «сходи - вакуолізована мікроспора» (Лобанова, 2008), відрізняються більш високими показниками гаплопродукції в культурі пиляків пшениці. Тому для добору найбільш чутливих до андрогенезу генотипів та ефективного проходження процесу гаплопродукції рекомендовано залучати форми із слабкою ФПЧ, тривалістю яровизації (ТЯ) 20-30 діб і нетривалим періодом «сходи - вакуолізована мікроспора». Добір матеріалу пшениці для наступного введення в культуру пиляків *in vitro* проводять, коли більша частина мікроспор у пиляках знаходиться на фазі вакуолізації. Фазу розвитку мікроспор визначають цитологічним методом на тимчасових мікропрепаратах пиляків, забарвлених оцетокарміном (Паушева, 1988), під світловим мікроскопом.

2.3. Попередня обробка пагонів донорних рослин

Для ефективного проходження всіх етапів процесу гаплопродукції необхідним є застосування попередніх холодкових обробок зрізаних пагонів з колоссям від донорних рослин м'якої пшениці. Рекомендуються наступні умови попередньої холодової обробки зрізаних пагонів: +2 °С – +4 °С у темряві протягом 3-5 діб у водному розчині АБК. Для генотипів озимої м'якої пшениці, вирощеної у камері штучного клімату, використовують концентрацію АБК 0,1 мг/л, для ярих генотипів – 0,5 мг/л. Для озимої пшениці, вирощеної в польових умовах, – 0,5 мг/л АБК (Лобанова, 2008).

2.4. Стерилізація колосся

Колос відділяють від пагону, зрізають ості та три нижніх і верхніх колоски (мікроспори яких відстають у розвитку). Оброблені таким чином колоси кладуть у чашки Петрі (d = 100 мм) та поверхнево стерилізують в умовах ламінар-боксу насиченим розчином гіпохлориту кальцію (40 хв), промивають 0,01 н стерильним розчином HCl (10 хв), чотири рази промивають стерильною дистильованою водою (Лукьянюк, Игнатова, 1980).

2.5. Виділення пиляків м'якої пшениці та їх введення в культуру *in vitro*

В асептичних умовах ламінар-боксу за допомогою скальпеля та пінцету в стерильних чашках Петрі з колосків виділяють пиляки. Усі маніпуляції в процесі виділення пиляків проводять за присутності в чашках Петрі 1-3 мл

стерильної дистильованої води для запобігання висихання пиляків. Ізольовані пиляки висаджують на індукційне живильне середовище 190-2 (Wang, Hu, 1984) у модифікації – з додаванням 1,5 мг/л 2,4-Д, 90 г/л сахарози, 400 мг/л проліну, 400 мг/л глутаміну, 0,5 мг/л кінетину (Жосонарь, 2005). Висаджені пиляки культивують перші три доби у темряві при температурі +30 °С, далі при +24 °С до появи новоутворень.

2.6. Тестування перших етапів морфогенезу мікроспор за культивування пиляків в умовах *in vitro*

Для можливості прогнозування рівня чутливості генотипу до андрогенезу *in vitro* проводять тестування морфогенезу мікроспор у пиляках в процесі їх розвитку за спорофітною програмою на першому етапі культивування пиляків. Тестування проводять шляхом випадкового добору з пробірки 10 пиляків, що використовують для приготування тимчасових оцетокармінових препаратів. На предметне скло кладуть 3-4 пиляка в краплю оцетокарміна, скальпелем роздіблюють їх до кашоподібної маси, накривають покривним склом і злегка натискають. При попаданні повітря між предметним та покривним склом додають краплю 45 % оцтової кислоти. Виготовлені препарати досліджують під мікроскопом при збільшенні окуляра 10X і об'єктиву 10X. В 10 полях зору підраховують кількість мікроспор, що розвиваються за спорофітним шляхом, розбиваючи їх на класи за морфологією – багатоядерні, багатоклітинні, ембріодопоподібні. Кожний генотип досліджується темпорально три рази: через 10, 15 та 20-25 діб культивування *in vitro*. Аналізуючи результати тестування, можливо одержати орієнтовний висновок щодо прогнозованого рівня подальшої регенерації у досліджених генотипів.

При складанні прогнозу гаплопродукційної здатності того або іншого генотипу враховують такі параметри:

- кількість морфогенних мікроспор;
- час появи багатоядерних структур;
- час появи багатоклітинних структур;
- наявність ембріодопоподібних структур.

2.7. Умови культивування новоутворень та живильні середовища для регенерації рослин

Сформовані на поверхні пиляків макроструктури для проходження темної фази культивування переносять на живильне модифіковане середовище MS (Жосонарь, 2005): 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л кінетину, 200 мг/л проліну, 200 мг/л глутаміну. Новоутворення культивують у темряві 3-4 тижня при температурі +24 °С до появи центрів регенерації. Далі такі макроструктури культивують за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 10 тис. люкс, при температурі +24 °С до формування рослин.

Для підвищення рівня регенерації зелених рослин (рис. 2) у культурі пиляків озимої м'якої пшениці пропонується культивування сформованих ембріодів (після темної фази етапу регенерації) на живильному середовищі

MS із доданням 0,25 мг/л АБК. Для морфогенних калусів – додання до живильного середовища MS гіберелової (0,5 мг/л) та яблучної кислот (25 мг/л) і крохмалю (1 мг/л), за температури культивування +9 °С – +12 °С і 16-годинного фотоперіоду. Зелені рослини пересаджують на безгормональне живильне середовище MS. У результаті вказаних модифікацій регенерація зелених рослин зросла в 3-5 разів, а регенерація альбіносних рослин зменшилась в 2,5 рази (Лобанова, 2009).

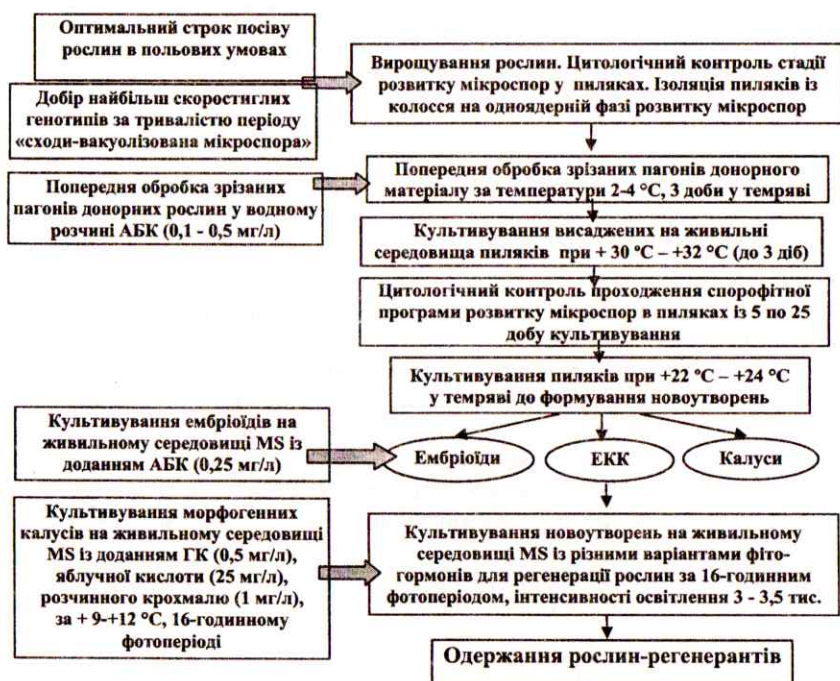


Рис. 2. Схема вдосконалення етапів біотехнології одержання рослин-регенерантів у культурі пиляків м'якої пшениці

2.8. Дорошування та яровизація отриманих рослин-регенерантів озимої м'якої пшениці. Отримання насіннєвого потомства

Диплоїдизацію рослин проводили, коли регенеранти мали розвинуту кореневу систему, шляхом культивування на рідкому живильному середовищі з додаванням 0,03 % колхіцину, протягом 10 діб при температурі +10 °С – +16 °С та 16-годинному фотоперіоді. Після проведення диплоїдизації рослини висаджували у ґрунт та яровизували протягом 40-60 діб. Потім рослини дорошували в умовах штучного клімату.

ДОДАТОК 1

Матеріали та обладнання

Для роботи з культурою пиляків пшениці необхідні стандартне обладнання і матеріали, що використовуються в біотехнологічній лабораторії, а саме:

- ламінар-бокс (або кімната для стерильних робіт);
- опромінювач бактерицидний;
- автоклав;
- дистиллятор, бідистиллятор;
- термостат;
- ваги аналітичні;
- рН-метр;
- шафа сушильна; сухожарова шафа;
- лупа біноклярна;
- мікроскоп;
- електроплитка; магнітна мішалка;
- стелаж із штучним освітленням;
- яровизаційна камера;
- лабораторний інструмент (пінцети, скальпелі тощо);
- лабораторний посуд (чашки Петрі, хімічні склянки, колби, мірні циліндри, широкі пробірки);
- хімічні реактиви для приготування живильних середовищ;
- спирт етиловий 96 %;
- стерилізуючі розчини (гіпохлорит кальцію, комерційні препарати «Білізна», «Domestos»);
- допоміжні матеріали (вата, марля, фільтрувальний папір, плівка або фольга для закривання пробірок).

ДОДАТОК 2

Штучні живильні середовища

Середовище 190-2 (pH 5,7)

Макроелементи:		Мікроелементи:	
KNO ₃	10 г/л	MnSO ₄ · 4H ₂ O	160 мг/л
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 г/л	MnSO ₄	60 мг/л
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1 г/л	KI	10 мг/л
KH ₂ PO ₄	3 г/л	FeSO ₄ · 7H ₂ O	5,56 мг/л
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2 г/л		
KCl	0,4 г/л		
гліцин		20 мг/л	
тіамін		10 мг/л	
піридоксин		5 мг/л	
нікотинова кислота		5 мг/л	
інозит		1000 мг/л	
Fe – халат		10 мг/л	
2,4-D		1,5 мг/л	
гелріт		3,5 г/л	
сахароза		90 г/л	

Середовище MS (pH 5,7)

Макроелементи:		Мікроелементи:	
NH ₄ NO ₃	1650 мг/л	KI	0,83 мг/л
KNO ₃	900 мг/л	H ₃ BO ₃	6,2 мг/л
CaCl ₂	331 мг/л	MnSO ₄ · 5H ₂ O	24,1 мг/л
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 мг/л	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6 мг/л
KH ₂ PO ₄	170 мг/л	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 мг/л
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025 мг/л
Fe – хелат		10 мг/л	
мезо-інозит		100 мг/л	
нікотинова кислота		0,5 мг/л	
піридоксин		0,1 мг/л	
гліцин		2 мг/л	
тіамін		0,4 мг/л	
гелріт		3,5 г/л	
сахароза		30 г/л	

ЛІТЕРАТУРА

1. Wang X. The effect of potato II medium for triticales anther culture / X. Wang, H. Hu // Plant Sci. Lett. – 1984. – Vol. 36. – P. 237 – 239.
2. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog, // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
3. Лаптев Ю. П. Гетероплоидия в селекции растений / Ю. П. Лаптев – М.: Колос, 1984. – 247 с.
4. Лукьянюк С. Ф. Метод гаплоидии в селекции зерновых культур / С. Ф. Лукьянюк, С. А. Игнатова // Сельскохозяйственная биотехнология. – 1985. – № 5. – С. 8 – 15.
5. Махновська М. Л. Удосконалення технології одержання подвоєних андрогенних гаплоїдів озимої м'якої пшениці / М. Л. Махновська, М. А. Литвиненко, С. О. Ігнатова // НТБ СГП. – 1997. – № 1. – С. 32–36.
6. Ігнатова С. О. Біотехнологічні основи одержання гаплоїдів, віддалених гібридів і соматичних регенерантів зернових і бобових культур в різних системах *in vitro* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / С. О. Ігнатова – Ялта, 2004. – 46 с.
7. Тоцький В. М. Генетика / В. М. Тоцький. – Одеса: Астропринт, 2002. – 712 с.
8. Тырнов В. С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация / В. С. Тырнов // Учеб. пособие для студентов биол. фак. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 44 с.
9. Parisi L. Disease response of doubled haploid lines and their original cultivars in wheat (*Triticum aestivum* L.) / L. Parisi, E. Picard / Z. Planthenzuchtg. – 1986. – Vol. 96. – P. 63–68.
10. Дьячук Т. И. Методические рекомендации по получению гаплоидных растений мягкой пшеницы в культуре пыльников / Т. И. Дьячук, П. А. Дьячук. – М., 1989. – 36 с.
11. Жосонарь М. В. Регенерационная способность различных по продолжительности яровизации и фотопериодической чувствительности сортов озимой пшеницы в культуре пыльников *in vitro* / М. В. Жосонарь, С. А. Игнатова, В. И. Файт, В. Р. Фёдорова // Вісник Харківського національного аграрного університету. – Харків, Серія: біологія. – 2004. – Вип. 2 (5). – С. 79–83.
12. Лобанова Е. И., Игнатова С. А., Шестопал О. Л., Нарган Т. П. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разным периодом «всходы-колошение» // Фактори експериментальної еволюції організмів : IV Міжнар. наук. конф., 22-26 вересня 2008 р.: зб. наук. праць. – Алушта, 2008. – С. 291–297.
13. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимов Н. Г., Наволоцкий В. Д. Получение гаплоидов ячменя при гибридизации с *Hordeum bulbosum* // Актуальные вопросы генетики и селекции: I Сибирская конф.: тезисы докл. – Барнаул, 1980. – С. 49.

14. Жосонарь М. В. и др. Гаплопродукционная способность в культуре пыльников сортов и линий озимой мягкой пшеницы, различающихся по генам роста и развития / М. В. Жосонарь // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. – 2005. – Вип. 2, № 7. – С. 94-99.
15. Лобанова К. І. Регенерація рослин в культурі пиляків озимої м'якої пшениці, шляхи її підвищення : автореф. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.20 «Біотехнологія» / К.І. Лобанова. – Одеса, 2009. – 20 с.

Наукове-виробниче видання

Отримання подвосних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків

Методичні рекомендації

Автори: Ігнатова С.О., Жосонарь М.В.,
Лобанова К.І. та інші.

Підписано до друку з готового оригінал-макету 12.12.08.
Умов. друк. арк. 0,7. Формат 60х84 1/16.
Папір офсетний. Друк різнографічний.
Тираж 100 прим. Зам. № 667.

Друкарня ТОВ «Фірма «ІНТЕРПРІНТ»
65012, м. Одеса, вул. Пантелеймонівська, 15-А,
тел. 777-08-84, 777-04-64