

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення



**ОТРИМАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ
РИСУ ПОСІВНОГО (*ORYZA* spp.)
МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO***



Методичні рекомендації

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

**ОТРИМАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ
РИСУ ПОСІВНОГО (*ORYZA* SPP.)
МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO***

Методичні рекомендації

Одеса
«Астропринт»
2019

УДК 602.6:58:633.181.1
О-862

Друкується за рішенням вченої ради Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (протокол № 3 від 11.05.2019 р.)

Автори:

І. С. Замбріборщ, к. б. н., зав. лаб.;
О. Л. Шестопад, к. б. н.;
Д. В. Шпак, к. с.-г. н.;
М. С. Чекалова, молод. наук. співроб.

Рецензент:

В. І. Файт, д. б. н., чл.-кор. НААН України

Відповідальний за випуск: директор СГІ — НЦНС, чл.-кор. НААН України **В. М. Соколов**

Отримання подвоєних гаплоїдів рису посівного (*Oryza spp.*) О-862 методом культури пиляків *in vitro* : методичні рекомендації / авт. : І. С. Замбріборщ, О. Л. Шестопад, Д. В. Шпак, М. С. Чекалова ; СГІ — НЦНС. — Одеса : Астропринт, 2019. — 12 с.
ISBN 978–966–927–587–5

Обґрунтовано принципи і викладено методичні розробки з одержання подвоєних гаплоїдів рису посівного методом культури пиляків *in vitro*.

Рекомендації розраховані на спеціалістів в області біотехнології, генетики та селекції рослин.

УДК 602.6:58:633.181.1

ISBN 978–966–927–587–5

© Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства
та сортовивчення (СГІ — НЦНС), 2019

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	4
Вступ	4
1. Опис методу	5
2. Одержання подвоєних гаплоїдів рису посівного в культурі пиляків в умовах <i>in vitro</i>	6
2.1. Умови вирощування донорних рослин рису посівного	6
2.2. Добір матеріалу рису посівного в культурі пиляків <i>in vitro</i>	7
2.3. Попередня обробка пагонів донорних рослин	7
2.4. Стерилізація волотей	7
2.5. Виділення пиляків та введення їх у культуру <i>in vitro</i>	7
2.6. Умови культивування новоутворень та живильні середовища для регенерації рослин	8
2.7. Дорошування отриманих рослин-регенерантів рису посівного. Отримання насіннєвого потомства	8
Додаток 1 Матеріали та обладнання	9
Додаток 2 Склад живильних середовищ	10
Список бібліографічних посилань	11

ПЕРЕШІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БАП — 6-бензиламінопурин
2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
НОК — α -нафтилгоцтова кислота
N6 — живильне середовище за прописом Чу (Чу, 1978)
MS — живильне середовище (Murashige, Skoog, 1962)

ВСТУП

У селекційно-генетичній роботі із різними злаковими культурами дедалі затребуванішим та необхіднішим є застосування біотехнологій, а саме культури ізолюваних пиляків. Отримання гаплоїдів через культуру ізолюваних пиляків — це альтернатива традиційним селекційним підходам з поліпшення рису посівного (*Oryza sativa*). Головною перевагою використання гаплоїдів у селекції є можливість створення гомозиготних ліній у короткій термін [1–6].

Дослідження показали, що індукція андрогенного каллосу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* виявилася надзвичайно низькою, тоді як сорти підвиду *Jaratica* є чутливими до умов *in vitro*. Високий відсоток диплоїдних регенерантів із каллусів у культурі пиляків рису — часте явище. Воно є результатом спонтанної диплоїдизації гаплоїдів і відіграє важливу роль у продукуванні гомозиготних рослин протягом короткого періоду.

Важливим компонентом середовища є джерело вуглецю, яке виконує в умовах *in vitro* дві функції — трофічну та підтримки необхідного осмотичного потенціалу в клітинах ізолюваних пиляків за їхнього культивування. Частіше всього з цією метою використовують сахарозу. Вважається, що підвищена її концентрація важлива для всіх злаків на етапі утворення багатоклітинних структурних елементів — каллусних та ембріонічних [7]. Декотрі азійські дослідники використовують в якості джерела вуглецю у середовищах для культивування пиляків рису інші вуглеводні, а саме мальтозу [8–10].

Біотехнологічні методи мають велике значення для поліпшення і прискорення селекційного процесу, а саме, дають можливість отримати нові форми рису, стійкі до різних несприятливих факторів, масимально швидко і без залучення великих посівних площ.

Отже, використання методів біотехнології для створення гомозиготних ліній рису є перспективним напрямом досліджень, оскільки дана розробка матиме і теоретичне значення, і практичне впровадження.

1. ОПИС МЕТОДУ

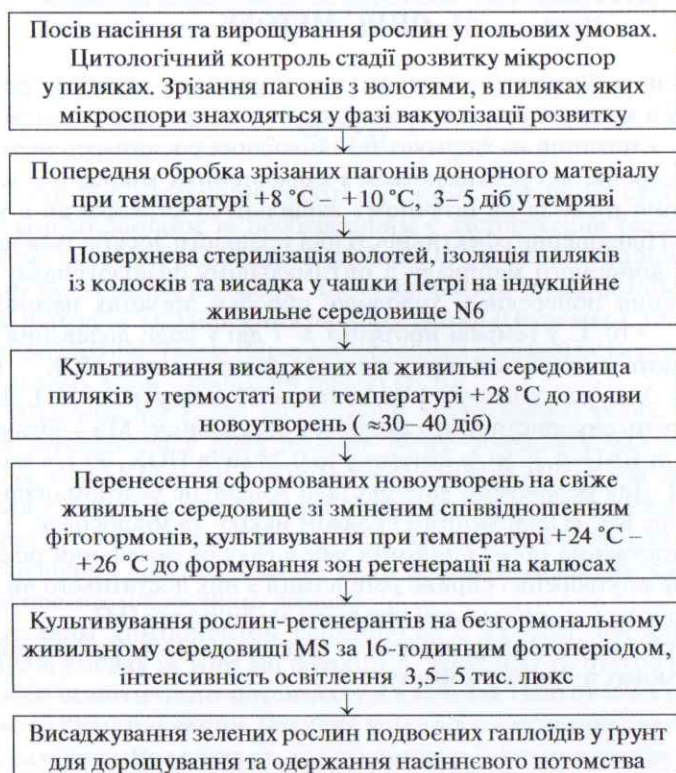
В основі біотехнології отримання подвоєних гаплоїдів рису посівного в культурі пиляків лежить процес андрогенезу (андрокінії) *in vitro*, оснований на формуванні гаплоїдних рослин-регенерантів із новоутворень, які розвиваються з морфотенних мікроспор за культивування пиляків на штучному живильному середовищі в умовах *in vitro*. Підвищення ефективності цієї технології досягається шляхом добору донорного матеріалу в оптимальному фізіологічному стані; проведення попередньої холодової обробки зрізаних панонів: при $+8^{\circ}\text{C}$ — $+10^{\circ}\text{C}$ у темряві протягом 3–7 діб у воді; додавання до індукційного живильного середовища N_6 фітогормонів: НОК — 1 мг/л, 2,4-Д — 3 мг/л та кінетину 1 мг/л; також 50 г/л пукрози [11]. Для новотворень використовують живильне середовище: MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л мальтози [12–13]. Для регенерації використали живильне безгормональне середовище MS із половинним складом макро- та мікроелементів.

Застосування таких прийомів забезпечує оптимальний рівень індукції новоутворень і сприяє регенерації з них достатнього числа зрілих рослин за мінімальної кількості альбіносних [14].

Одержані рослини-регенеранти пересаджують у ґрунт та дорощують в умовах штучного клімату.

2. ОДЕРЖАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ РИСУ ПОСІВНОГО В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

Роботу із культури пиляків рису проводили за загальноприйнятою схемою.



2.1. Умови вирощування донорних рослин рису посівного

Сприятливі кліматичні умови вирощування рослин *in vivo* забезпечують оптимальний фізіологічний стан донорних рослин, що, своєю чергою, визначає результативність методу культури пиляків рису в умовах *in vitro*. Для досягнення високого виходу рослин-регенерантів у культурі пиляків злакових культур необхідно чітко дотримуватися

оптимальних строків висіву донорного матеріалу в польових умовах конкретного регіону вирощування.

2.2. Добір матеріалу рису посівного в культуру пиляків *in vitro*

Добирають матеріал рису для наступного культивування пиляків *in vitro* в період, коли більша частина мікроспор у пиляках знаходиться у фазі вакуолізації. Фазу розвитку мікроспор визначають цитологічним методом на тимчасових мікропрепаратах пиляків, забарвлених оцетокарміном (Паушева З. П., 1988), під світловим мікроскопом.

2.3. Попередня обробка пагонів донорних рослин

Для ефективного проходження всіх етапів процесу гаплопродукції необхідно застосовувати попередні холододові обробки зрізаних пагонів з колоссям від донорних рослин. Рекомендуються такі умови попередньої холододової обробки зрізаних пагонів: +8 °C – +10 °C у темряві протягом 3–7 діб у воді.

2.4. Стерилізація волотей

Волоті відділяють від обгорток, зрізають нижні і верхні колоски (мікроспори яких відстають у розвитку (нижні) або випереджають (верхні) такі в колосках середньої частини волоті). Оброблені таким чином волоті розрізають на частини та кладуть у чашки Петрі (d = 100 мм) для поверхневої стерилізації. Останню проводять в умовах ламінар-боксу насиченим розчином гіпохлориту кальцію (5 хв), промивають 0,01 н стерильним розчином HCl (5 хв), чотири рази промивають стерильною дистильованою водою.

2.5. Виділення пиляків та введення їх у культуру *in vitro*

В асептичних умовах ламінар-боксу за допомогою скальпеля та пінцета в стерильних чашках Петрі з колосків виділяють пиляки. Усі маніпуляції в процесі виділення пиляків здійснюють за присутності в чашках Петрі 1–3 мл стерильної дистильованої води для запобігання висихання пиляків. Ізольовані пиляки висаджують у чашки Петрі (d = 6 мм) на індукційне живильне середовище N6 за модифікацією Herath et al. [8] фітогормонів: НОК – 1 мг/л, 2,4-Д – 3 мг/л та кінетину – 1 мг/л, а також 50 г/л сахарози.

2.6. Умови культивування новоутворень та живильні середовища для регенерації рослин

Висаджені пиляки культують спершу в темряві за температури +25 °C до появи новоутворень. Для новоутворень використовують живильне середовище — MS з додаванням 0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л кінетину та 0,25 мг/л НОК, 30 г/л мальтози [9]. Новоутворення культують 2–3 тижні при інтенсивності освітлення 5–8 тис. люкс за температури +25–26 °C до появи центрів регенерації.

Для підвищення рівня регенерації зелених рослин у культурі пиляків рису посівного пропонується використовувати в індукційному живильному середовищі N_6 в якості джерела вуглецю **сахарозу**, а на етапі культивування сформованих ембріоїдів (етап регенерації) в середовищі $\frac{1}{2}$ MS — **мальтозу**. Вибір оптимального джерела вуглецю, який забезпечує рослинні клітини енергією та живильними речовинами, залежить від внутрішньоклітинного метаболізму різних тканин даного виду. При культивуванні пиляків на штучному живильному середовищі з сахарозою з мікроспор формується достатня кількість новоутворень із високим морфогенним потенціалом. Далі на регенераційному живильному середовищі з мальтозою забезпечується максимально можливий, для даних умов експерименту, рівень регенерації зелених рослин.

У результаті застосування зазначених модифікацій регенерація зелених рослин зросла в 3–5 разів, а регенерація альбіносів зменшилась у 2 рази [14].

2.7. Дорошування отриманих рослин-регенерантів рису посівного. Отримання насіннєвого потомства

Для культивування отриманих у культурі пиляків регенерантів використовують безгормональне живильне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей. Зелені рослини із добре розвинутою кореневою системою висаджують у ґрунтосуміш для адаптації до умов *in vivo*. Адаптовані рослини передаються в Інститут рису спеціалістам для дорошування та отримання насіння. Спонтанна диплоїдизація гаплоїдних регенерантів становить 30–35 відсотків.

Додаток 1 МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

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

- ламінар-бокс (або кімната для стерильних робіт);
- опромінювач бактерицидний;
- автоклав;
- дистилятор, бідистилятор;
- термостат;
- ваги аналітичні;
- рН-метр;
- шафа сушильна; сушожарова шафа;
- лупа біноклярна;
- мікроскоп;
- електроплитка; магнітна мішалка;
- стелаж зі штучним освітленням;
- 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, комерційний препарат «Білизна»);
- допоміжні матеріали (вата, марля, фільтрувальний папір, парафільм, плівка або фольга для закривання пробірок).

Додаток 2
СКЛАД ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Середовище N6 (pH 5,8)

Макроелементи:		Мікроелементи:	
KNO ₃	2830 мг/л	MnSO ₄ · 4H ₂ O	4,4 мг/л
(NH ₄) ₂ SO ₄	463 мг/л	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 мг/л
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166 мг/л	H ₃ BO ₃	1,6 мг/л
KH ₂ PO ₄	460 мг/л	KI	0,8 мг/л
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	185 мг/л	KCl	0,4 мг/л
Fe-хелат	10 мг/л	мезо-інозит	100 мг/л
гліцин	2,0 мг/л	2,4-D	3,0 мг/л
тіамін	1,0 мг/л	НОК	1,0 мг/л
піридоксин	0,5 мг/л	кінетин	1,0 мг/л
нікотинава кислота	0,5 мг/л	сахароза	50 г/л
казеїна гідролізат	500 мг/л	агар «Sigma»	8 г/л

Середовище MS (pH 5,8)

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		
нікотинава кислота	0,5 мг/л		
піридоксин	0,1 мг/л		
гліцин	2,0 мг/л		
тіамін	0,4 мг/л		
БАП	0,75 мг/л		
кінетин	0,25 мг/л		
НОК	0,25 мг/л		
мальтоза	30 мг/л		
агар «Sigma»	8 г/л		

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Xa T., Lang N. Rice breeding for high grain quality through anther culture. *Omonrice*. 2011. № 18. P. 68–72.
2. Lovelin Kaushal, S. M. Balachandran, K. Ulaganathan, K. Shenoy. Effect of Culture Media on Improving Anther Culture Response of Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2014. № 18. С. 218–224.
3. Замбріборщ І. С., Шестопа О. Л., Ігнатова С. О. Створення *in vitro* вихідного селекційного матеріалу пшениці та рису. *Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин*. Одеса: Астропринт, 2016. С. 139–148.
4. Шпак Д. В., Замбріборщ І. С., Шестопа О. Л. Ранньостиглий селекційний матеріал рису, створений методом культури *in vitro*. *Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин*. Одеса: Астропринт, 2016. С. 174–180.
5. Замбріборщ І. С., Шестопа О. Л. Использование метода гаплоидии (андрогенез *in vitro*) в селекционном процессе злаковых культур Юга Украины. *Биология клеток растений in vitro и биотехнология: тезисы докладов XI Международной конференции*. Минск, 2018. С. 72–73.
6. Шпак Д. В., Замбріборщ І. С., Шестопа О. Л. Продуктивність та якість зерна ліній рису, створених з використанням методів культури *IN VITRO*. *Біотехнологія — інноваційний шлях розвитку селекції рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції*. Одеса, 2018. С. 150–151.
7. Tran Th. Th. Xa, Nguyen Thi Lang. Rice breeding for high grain quality through anther culture. *Omonrice*. 2011. Vol. 18. P. 68–72.
8. Martinez A. L., Ventura E., Maldonado U., Sanchez M. M., Bazaldea Cr., del Villar A. A. Characterization of storage proteins and anther culture for the development of high nutritional quality rice genotypes. *Biotechnology Aplicada*. 2005. Vol. 22. P. 41–44.
9. Bagheri N., Babaeian-Jelodar N., Ghanbari Ali. Evaluation of effective factors in anther culture of iranian rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Bi-harean Biologist*. 2009. Vol. 3, No. 2. P. 119–124.
10. Trejo-Tapia G., Amaya U. M., Morales G. S., Jimenez-Aparicio A. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002. Vol. 71. P. 41–46.

11. Herath H. M. I., Bandara D. C., Samarajeewa P. K. Effect of culture media for another culture of Indica rice varieties and hybrids of Indica and Japonica. *Tropical Agricultural Research & Extension*. 2007. V. 10. P. 17–22.
12. Замбріборщ І. С., Шестопа О. Л., Добрава Г. О., Шпак Д. В. Особливості андрогенезу *in vitro* міжсортних гібридів *Oryza sativa* L. української селекції. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: VIII Міжнар. наук. конфер. Алушта, 2013. Т. 12. С. 224–228.
13. Шестопа О. Л., Замбріборщ І. С., Шпак Д. В. Вплив вуглецевого компоненту живильного середовища на ефективність андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. пр. НАН України / Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2015. Т. 17. С. 160–163.
14. Спосіб отримання ліній рису: пат. 108514 України, № u201512317; заявл. 14.12.2015; опубл. 25.07.2016. Бюл. № 14/2016.

Науково-виробниче видання

ЗАМБРІБОРЩ Ірина Сергіївна
ШЕСТОПА Олександра Леонідівна
ШПАК Дмитро Васильович
ЧЕКАЛОВА Марія Сергіївна

**ОТРИМАННЯ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ РИСУ
ПОСІВНОГО (*ORYZA* spp.) МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ
ПИЛЯКІВ *IN VITRO***

Методичні рекомендації

Завідувачка редакції Т. М. Забанова
Редактори В. Я. Крижанівський, М. Г. Музикант

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,7.
Тираж 50 прим. Зам. № 718 (132).

Друкарня видавництва «Астропринт»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21
Тел.: (0482) 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855

e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua; www.stranichka.in.ua
Свідомство суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.