

Національна академія аграрних наук України
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ СТВОРЕННЯ
ГОМОЗИГОТНИХ ЛІНІЙ СОРГО ЦУКРОВОГО**

Методичні рекомендації



Київ – 2015

УДК: 633.62:581.143.6:575.143

Методичні рекомендації розробили наукові співробітники Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН:

Бех Наталія Степанівна, старший науковий співробітник, завідувач сектору культури клітин і тканин *in vitro*;

Коцар Марія Олександрівна, молодший науковий співробітник;

Присяжнюк Олег Іванович, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії математичного моделювання та інформаційних технологій ІБКіЦБ

Рецензенти:

Балан В.М., доктор с.-г. наук, професор

Калатур К.А., кандидат с.-г. наук

Методичні рекомендації «Біотехнологічні методи створення гомозиготних ліній сорго цукрового» призначені для спеціалістів у галузі селекції і біотехнології рослин, фахівців науково-дослідних установ, викладачів, аспірантів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації сільськогосподарського профілю.

Рекомендовано до друку

**Вченою радою Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків
від 14.12.2015 року (протокол № 22)**

© Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, 2015

© Бех Н.С., Коцар М.О., Присяжнюк О.І., 2015

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ.....	5
2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА	6
2.1 Приготування маточних розчинів	6
2.2 Приготування живильного середовища.....	6
3. КУЛЬТУРА НЕЗАПЛІДНЕНИХ НАСІННЄВИХ ЗАЧАТКІВ.....	8
3.1 Отримання стерильної культури ізольованих незапліднених насінневих зачатків	8
3.2 Гаплоіндукція з незапліднених насінневих зачатків сорго цукрового... 10	
3.3 Визначення рівня геному регенерантів сорго цукрового	10
3.4 Поліплоїдизування гаплоїдних пагонів <i>in vitro</i>	11
3.5 Адаптація рослин сорго цукрового з <i>in vitro</i> до умов відкритого ґрунту	13
4. ЕТАПИ СТВОРЕННЯ ГОМОЗИГОТНИХ ЛІНІЙ СОРГО ЦУКРОВОГО .	14
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	16

ВСТУП

Тривалий час у країнах Західної Європи розвиваються новітні технології переробки біомаси рослинного походження на паливо. Головною вимогою до культур, які використовуються в біоенергетиці, є собівартість продукції та забезпечення стабільної сировинної бази [1]. Однією із таких культур може бути сорго цукрове, оскільки сік стебел має вміст вуглеводів 16-20 %, із яких 60-80 % цукрози і 20-40 % фруктози та глюкози. Сорго використовують для одержання етанолу та у вигляді силосної маси. Винятковою біологічною особливістю сорго цукрового є його здатність розвиватись при високих температурах і мінімальних запасах вологи у ґрунті [2].

Для України є особливо актуальним виробництво дешевих цукровмісних продуктів, які можуть бути отримані з біоенергетичної сировини сільськогосподарського призначення. Враховуючи важливість цієї проблеми, необхідно розвивати методи прискорення селекційного процесу енергетичних культур, які дозволять швидко розмножити і зберегти в чистоті отримані цінні селекційні матеріали та створити нові генотипи [3, 4].

Перехід на лінійну селекцію ставить завдання створення гомозиготних ліній. Використання гаплоїдії дозволяє досягти гомозиготності по всіх генах, а розробка методу клонального мікророзмноження забезпечить швидке розмноження при збереженні чистоти генотипу вихідної форми.

Розроблені методичні рекомендації дозволяють отримати гомозиготні лінії у культурі *in vitro* із незапліднених насінневих зачатків сорго цукрового та вихідний чистолінійний гомозиготний селекційний матеріал за 5 років, а також вивчити прояв дії рецесивних генів, внаслідок відсутності явища домінантності, що значно прискорить добір генотипів з бажаними ознаками.

1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ

Для введення в культуру *in vitro* незапліднених насінневих зачатків сорго цукрового та культивування культури пагонів необхідні лабораторні приміщення, які укомплектовані спеціальним обладнанням:

1. кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, дистиллятором, стелажем для сушіння посуду;

2. лабораторна кімната для приготування середовищ, забезпечена технічними і аналітичними терезами, рН-метром, ди- та бідистилляторами, холодильником для зберігання маточних розчинів і реактивів, електроплиткою, водяною банею, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, мікроскопом;

3. приміщення для стерилізації живильного середовища, інструментів, посуду, з горизонтальними чи вертикальними автоклавами, сушильною шафою з режимом роботи 150-160 °С;

4. стерильне приміщення (бокс, операційна кімната) для ізоляції і пересадки культур. Для стерильних робіт використовують ламінар-бокси;

5. культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою повітря 24 ± 2 °С, відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 3-4 тис. лк., 16-годинним фотоперіодом, стелажми для розміщення колб і штативів з пробірками.

Інструменти і матеріали: пінцети хірургічні або анатомічні довжиною 20 см, скальпелі, спиртівка, проавтоклавований папір.

Посуд: для приготування живильного середовища – колби об'ємом 500 і 1000 мл, циліндри мірні об'ємом 10, 50, 100 мл, піпетки об'ємом 1, 2, 5, 10 мл; для культивування незапліднених насінневих зачатків – пробірки висотою 10 см; для культивування пагонів – колби Ерленмейера з термостійкого скла об'ємом 250-300 мл.

2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

2.1 Приготування маточних розчинів

Для приготування маточних розчинів використовують реактиви високої хімічної чистоти. Для зручності в роботі макроелементи готують у вигляді маточних розчинів, які в 10 разів більш концентровані, ніж необхідно для приготування середовищ. Їх зберігають в холодильнику не більше двох місяців за температури 4 ± 1 °С.

Розчини мікроелементів і вітамінів готують в 100 разів більш концентрованими і зберігають в замороженому стані.

При приготуванні хелатного заліза окремо розчиняють 37,3 мг Na_2EDTA (трилон Б) і 27,8 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Потім ці розчини зливають в одну колбу і доводять їх об'єм до 1000 мл.

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують відповідно їх властивостям:

1. 100 мг α -нафтилоцтової кислоти (α -НОК) або 100 мг індолілоцтової кислоти (ІОК) розчиняють в 0,5-2 мл етанолу, підігривають і доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);
2. 100 мг 6-бензиламінопурину (6-БАП) розчиняють у 1-2 мл 0,5 н HCl , підігривають на водяній бані і доводять до об'єму 100 мл бідистильованою водою;
3. вітаміни – тіамін (B_1), піридоксин (B_6), нікотинову кислоту (PP), аскорбінову кислоту (C) розчиняють у бідистильованій воді в концентрації 1 мг/мл.

2.2 Приготування живильного середовища (на 1 л розчину)

1. 6,5-7,0 г агару (залежно від марки) заливають бідистильованою водою ($\frac{1}{2}$ об'єму середовища);

2. агар розтоплюють на водяній бані або автоклавують за умов 1,25 атм упродовж 30 хв;
3. 20-40 г сахарози розчиняють у 100-150 мл дистильованої води за легкого нагрівання;
4. ємність для приготування середовища на 1/3 від запланованого об'єму наповнюють бідистильованою водою, додають необхідну кількість макро- та мікроелементів, Fe-хелату із маточних розчинів, наважку мезо-інозиту та розчин сахарози. Вітаміни і гормони додаються за допомогою піпеток із маточних розчинів;
5. рН живильного середовища доводять до 5,6-5,8 за допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH, підігривають, додають розтоплений агар;
6. живильне середовище розливають по 10 мл у пробірки для культивування незапліднених насінневих зачатків та по 40 мл у 250-300 мл колби для культивування пагонів, закривають фольгою і стерилізують у автоклаві за умов 1,5 атм упродовж 60 хв.

3. КУЛЬТУРА НЕЗАПЛІДНЕНИХ НАСІННЄВИХ ЗАЧАТКІВ

У сорго, як і у більшості трав, використовують в якості експлантів молоді тканини, які розташовані близько до меристематичної зони (незрілі зародки, незрілі суцвіття). Труднощі їх культивування полягають внаслідок синтезу фенольних сполук у рослин сорго цукрового, які спостерігаються в утворенні чорних, фіолетових, помаранчевих пігментів, які виділяються у живильне середовище і пригнічують ріст і розвиток калюсних тканин, пагонів та унеможливають ембріогенез [5].

Розроблені протоколи живильних середовищ для сорго цукрового дозволяють отримати калюсну тканину і регенерацію рослин з незрілих зародків сорго [6]. Дані розробки можуть бути цінними інструментами для отримання калюсогенезу, органогенезу, клонального мікророзмноження та створення трансгенних рослин сорго цукрового з ознаками стійкості до біотичних і абіотичних стресів та з новим складом запасуючих білків ендосперму [7].

Використання методів гаплоіндукції та поліплоїдизування вихідних селекційних форм сорго цукрового сприятимуть отриманню нових гомозиготних ліній і поліплоїдних форм цієї культури адаптованих до кліматичних умов України, що забезпечить комерційне вирощування і отримання біосировини для різних галузей економіки.

3.1 Отримання стерильної культури ізольованих незапліднених насіннєвих зачатків

Для отримання звільненої від інфекції культури незапліднених насіннєвих зачатків сорго цукрового використовують волоть в стані виходу в трубку.

Зрізану волоть розміщують між листками зволоженого фільтрувального паперу і поміщають у поліетиленовий пакет разом з етикеткою, де вказують селекційний номер, дату і час взяття матеріалу.

Пакети з рослинним матеріалом зберігають у холодильнику за температури +4 °С – 2 доби.

Для отримання звільненої від інфекції культури незапліднених насінневих зачатків сорго цукрового проводять обробку волоті, поділену на сегменти, стерилізуючими розчинами. Попередню обробку проводять слабким розчином KMnO_4 – 2-3 хвилини, потім у розчині відбілювача «Білизна» масовою часткою 35 % за експозиції 40 хвилин.

Після стерилізації експланти промивають три рази стерильною дистильованою водою з інтервалом 20 хвилин.

Зав'язі, розміром 7-8 окуляр/мікрометрів, вилучають в стерильних умовах у ламінарному боксі під збільшувальною лупою та висаджують на модифіковані живильні середовища Мурасіге і Скуга (МС):

- МС + α -нафтилоцтова кислота (α -НОК) 0,5 мг/л + гліцин 2,0 мг/л + аскорбінова кислота 2 мг/л;
- МС + α -НОК 0,5 мг/л + глютамін 1 мг/л + 6-бензиламінопурин (6-БАП) 0,5 мг/л + дроп 1 мг/л;
- МС + α -НОК 0,5 мг/л + глютамін 1 мг/л + 6-БАП 5 мг/л + дроп 1 мг/л.

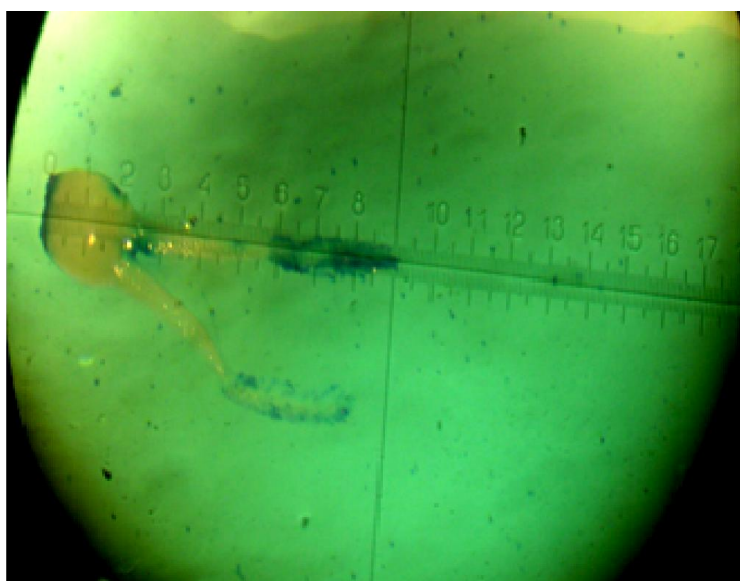


Рис. 3.1 Незапліднений насінневий зачаток сорго цукрового

3.2 Гаплоіндукція з незапліднених насінневих зачатків сорго цукрового

Основний принцип методу гаплоіндукції полягає в унікальній здатності рослинної клітини реалізувати закладену в ній генетичну інформацію, тобто під впливом екзогенних факторів давати початок новому організму нестатевим шляхом із ініціальних статевих клітин зародкового мішка. Питання, які стосуються регулювання генетичної програми насінневого зачатку на шлях морфогенезу, до цього часу залишаються відкритими.

Для направленої зміни гаметофітного способу розвитку незапліднених насінневих зачатків на спорофітний використовують абіотичні фактори культивування: температурний стрес та умови освітлення.

Пробірки з культурою зав'язей розміщують у термостаті без освітлення за температури 24 °С на два тижні, потім їх переносять у термальне приміщення з освітленням 3-4 тис. люкс за температури 24 °С і 16-годинному фотоперіоді.

Після появи проростків, їх пересаджують на живильне середовище МС без гормонів на 1-2 тижні. Потім переносять на живильне середовище для клонування пагонів: МС + 6-БАП 0,2-0,5 мг/л + кінетин 0,8-1,2 мг/л + сахароза 30,0 г/л.

3.3 Визначення рівня геному регенерантів сорго цукрового

Через п'ять пасажів культивування пагонів сорго цукрового проводять визначення рівня геному з використанням цитологічного методу на тимчасових препаратах метафазних пластинках точок росту [8]. Перед фіксацією рослинного матеріалу колби з пагонами ставлять на 12 годин у холодильник за температури +4 °С, а потім в термальне приміщення за температури 24±2 °С та освітленням інтенсивністю 3-4 тис. лк – на 2,5-3 години.

Після цього у стерильних умовах ламінарної камери відділяють 2-3 новоутворені пагони, а материнський пагін висаджують на середовище для клонування.

У новоутворених пагонах виділяють точку росту, яку занурюють у пробірку з водним розчином орто-оксихіноліну (масова частка 0,03 %) на 6 годин за кімнатної температури і тричі промивають дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв.

Мацерацію тканин проводять розчином спирту і соляної кислоти (дві частини 96 % етилового спирту і одна частина концентрованої соляної кислоти) – за експозиції 6 хв.

Після мацерації тканини промивають три рази дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв.

На предметному склі препарувальною голкою відокремлюють листочки, які прикривали точку росту (розміром 1-2 мм), і фарбують її у краплі розчину оцетоорсеїну (масова частка 3 %) упродовж 2-3 хв.

Пофарбований об'єкт накривають покривним склом. Фільтрувальним папером легким надавллюванням видаляють зайву фарбу. Дерев'яною паличкою легким надавллюванням на покривне скло готують тимчасовий давлений препарат. Проглядають препарати під мікроскопом при збільшенні об'єктиву x60, x90 і окуляру 15x, 17x.

Даний метод дозволяє відібрати гаплоїдні пагони (n=10), які в подальшому використовують для клонування і поліплоїдизування.

3.4 Поліплоїдизування гаплоїдних пагонів *in vitro*

Одним із найбільш ефективних способів отримання подвоєних гаплоїдів є культивування гаплоїдних пагонів на живильному середовищі з колхіцином.

Гаплоїдні пагони сорго цукрового культивують на модифікованому агаризованому живильному середовищі з додаванням колхіцину, масовою часткою 0,01-0,02 % з експозицією 2-4 доби.

Після обробки колхіцином культуральні пагони пересаджують на живильне середовище МС без гормонів на один тиждень для звільнення від мутагену. В подальшому культивують 2-3 пасажі на середовищі для клонування (рис. 3.2).

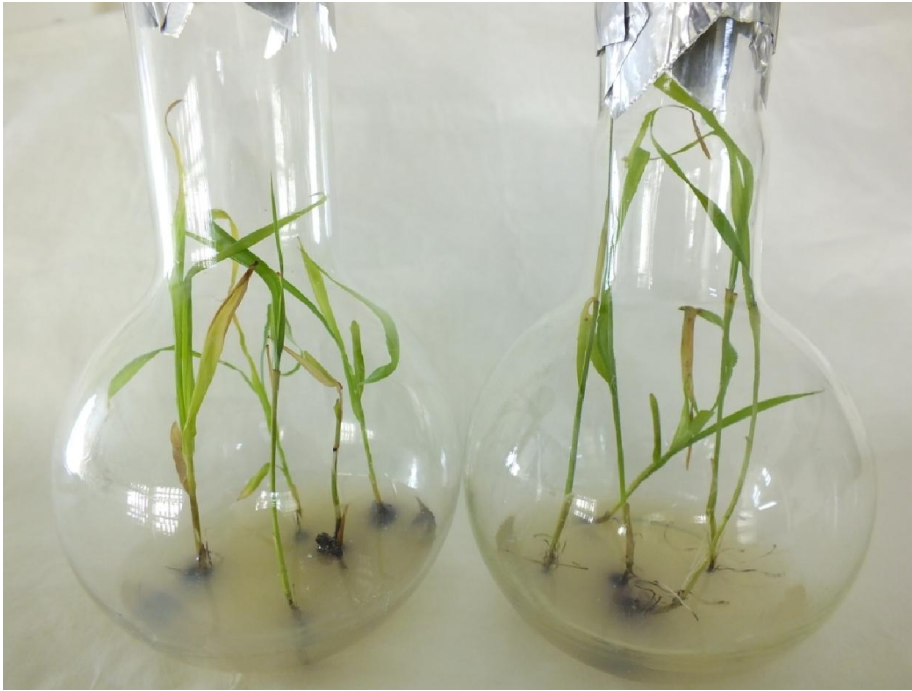


Рис. 3.2 Культура сорго цукрового на середовищі з колхіцином

Після 3-4 пасажів новоутворені пагони від кожного обробленого колхіцином клону аналізують за рівнем плоїдності.

Добирають тільки ті пагони сорго цукрового, у яких всі дочірні пагони 3-4 вегетативного покоління мають дигапloidний рівень геному ($2n=20$).

Після клонального мікророзмноження відібраний лінійний селекційний матеріал укорінюють на модифікованому середовищі МС + ІОК 0,6-0,8 мг/л + 6-НОК 0,6-0,8 мг/л + сахароза 30 г/л (рис. 3.3).



Рис. 3.3 Укорінення пагонів сорго цукрового

3.5 Адаптація рослин сорго цукрового з *in vitro* до умов відкритого ґрунту

При посадці рослин сорго цукрового з культури *in vitro* у відкритий ґрунт необхідними умовами є:

- глибина посадки – не більше 1,5-2 см;
- обов'язковий полив 1-2 рази на тиждень;
- накривання висадженої розсади ізоляційними ковпачками з отвором для створення мікроклімату на 7-14 діб.

Під час періоду вегетації у польових умовах проводять селекційну оцінку експериментальних рослин сорго цукрового: визначають параметри наростання вегетативної маси (висота рослин, кількість і ширина листків).

В кінці вегетації проводять збір насіння і оцінку рівня його геному.

4. ЕТАПИ СТВОРЕННЯ ГОМОЗИГОТНИХ ЛІНІЙ СОРГО ЦУКРОВОГО

За результатами досліджень розроблено схему по створенню гомозиготних ліній сорго цукрового з використанням біотехнологічних методів, що включають:

I етап – отримання гаплоіндукції з незапліднених зачатків з визначенням рівня геному регенерантів;

II етап – поліплоїдизування гаплоїдних пагонів *in vitro* з визначенням рівня геному у четвертому вегетативному поколінні пагонів після обробки колхіцином;

III етап – клональне мікророзмноження гомозиготних ліній, отримання розсади та вирощування рослин у відкритому ґрунті;

IV етап – отримання насіння та визначення рівня його геному (рис. 4.1).

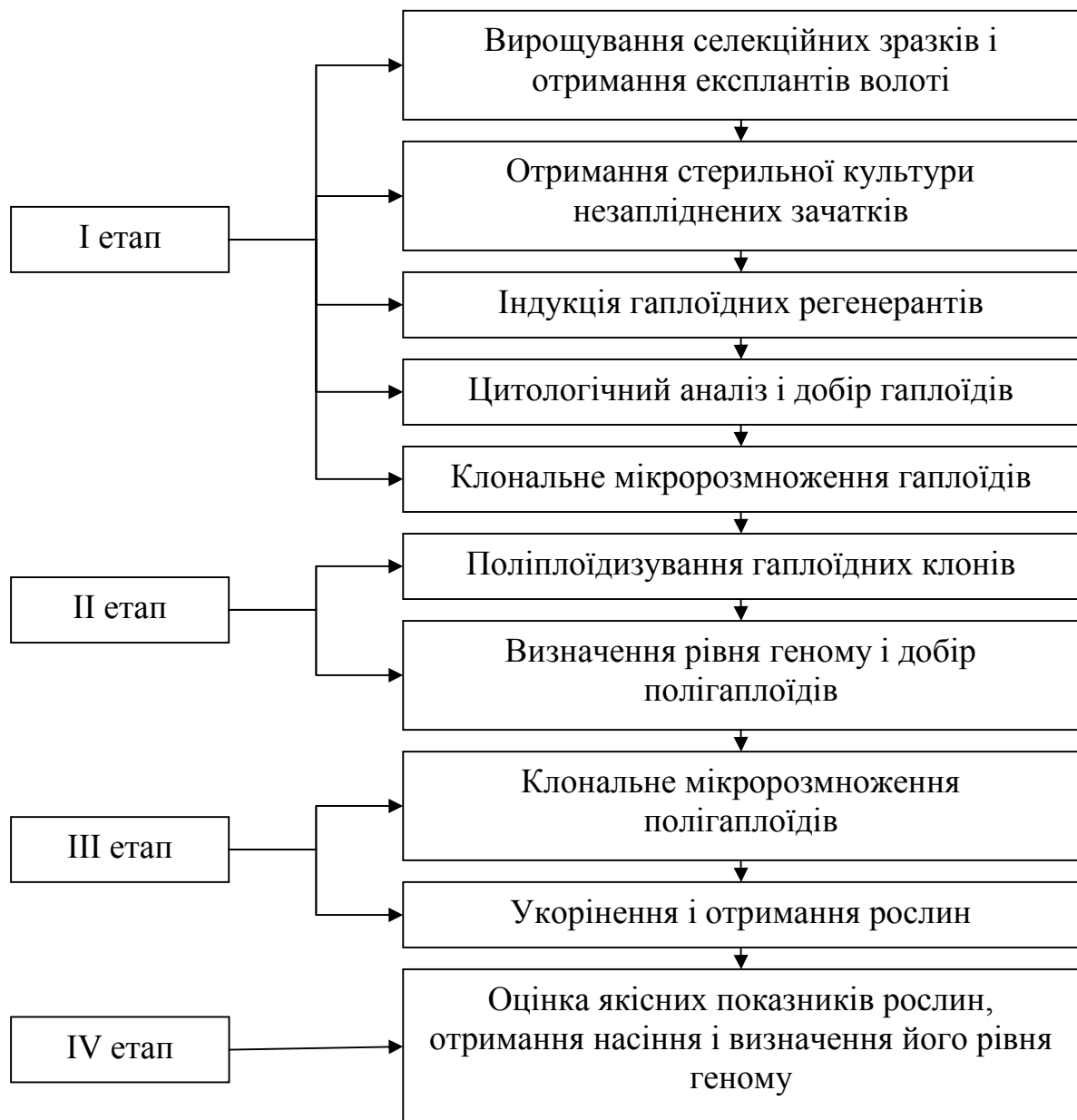


Рис. 4.1 Етапи створення гомозиготних ліній сорго цукрового з використанням біотехнологічних методів

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гелетуха Г.Г. Розвиток біоенергетики як інструмент заміщення природного газу в Україні / Г.Г. Гелетуха, Т.А. Железна // Біоенергетика. – 2015. – Вип. №1 (5). – С. 15-20.
2. Сінченко В.М. Класифікація видів біопалива та перспективи їх виробництва в Україні / В.М. Сінченко, М.Я. Гументик, В.С. Бондар // Біоенергетика. – 2014. – Вип. №1 (3). – С. 5-6.
3. Жученко А.А. Адаптационный потенциал культурных растений (экологические основы) / А.А. Жученко – Кишинев: Штиинца, 1999. – 768 с.
4. Яланский О.В. Перспективы впровадження високопродуктивних гібридів цукрового сорго у біоенергетику / О.В. Яланский, С.М. Остапенко, В.І. Серета // Збірник наукових праць. – Київ, 2013. – Вип. №19. – С. 124-128.
5. Davis M.E. Optimization of sorghum primary callus growth / M.E. Davis, G.H. Kidd // Z Pflanzenphysiol. – 1980. – Vol. №98. – P. 79-82.
6. Ma H.T. Callus induction and plant regeneration in grain sorghum / H.T. Ma, B.K. Chen, G.H. Liang // Sorghum Newslett. – 1984. – Vol. №27 – P. 141-142.
7. Green C.E. Plant regeneration from tissue cultures of maize / C.E. Green, R.L. Phillips // Crop sci. – 1975. – Vol. №15. – P. 417-421.
8. Ярмолюк Г.И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. / Г.И. Ярмолюк, Э.И. Ширяева. – К.: Наукова думка, 1982. – 54 с.

Наукове видання

**Біотехнологічні методи створення гомозиготних ліній
сорго цукрового
Методичні рекомендації**

*Відповідальний за випуск – О.І. Присяжнюк
Комп'ютерний набір – М.О. Коцар*

Підписано до друку 14.12.2015 р. Формат 60x84/16.
Папір Data Copy. Гарнітура Таймс. Друк циф. дуплікаттор.
Ум. Друк. Арк. 1,69. Обл.-вид. арк. 1,04.
Тираж 100. Зам. 17/03.
Видавництво – «ІБКіЦБ НААНУ».
Друк - ІБКіЦБ НААНУ.