

PROJEKTI LÕPPARUANNE

1. VALDKONNA NIMETUS: Taimakasvatus

2. PROJEKTI NIMETUS: Koekultuurimeetodite rakendamine sordiaretuses

3. PROJEKTI NIMETUS inglise keeles: Implementation of methods of tissue culture in plant breeding practice

4. PROJEKTI KESTUS

Algus: 2004

Lõpp: 2007

5. PROJEKTI TÄITJA: Jõgeva Sordiaretuse Instituut

Telefon: 7766901

Aadress: Aamisepa 1 Jõgeva alevik 48309

Registrikood: 70000869

Pangarekvisiidid: Rahandusministeerium A/k: 10220004799019; Viitenumber: 2500017012

6. PROJEKTI JUHT:

Mati Koppel

Ph D

(Ees- ja perekonnanimi)

(Ametikoht, teaduskraad)

7. RAHASTAMISE ALUS:3.4-2/7311.7 2004; 3.7-3.01/255 1.7 2005; 3.7-3.1/478 1.6. 2006; 3.4-23/437 1.7 2007

8. PROJEKTI TÄITJAD RAHASTAMISPERIOODI VÄLTEL (üksnes teema rahastamise raames tasustatud töötajad)

A. Projekti põhitäitjad (sh projekti juht):

| Ees- ja perekonnanimi | Teaduskraad | Ülesanded projekti täitmisel | Koormus | Personalikulu |
|-----------------------|-------------|------------------------------|---------|---------------|
| 1. Irina Puzõrjova | | Biotehnoloog | 0,8 | 237 926 |
| 2. Terje Põvvat | | Biotehnoloog | 0,8 | 68 383 |
| Kokku | | | | 306 309 |

B. Projektiga seotud abitöötajad:

| | | | | |
|--------------|--|-------------------------|-----|--------|
| Sirja Ohakas | | Taimede ettekasvatamine | 0,3 | 69 774 |
| Kokku | | | | 69 774 |

10. PROJEKTI ARUANNE (tehtud tööd, saadud uued teadmised ja tulemused jne):

Töö eesmärkideks oli teraviljade sordiaretust kiirendava topelthaploidide meetodi rakendamiseks vajaliku laboratooriumi sisustamine ja käikurakendamine. Jõgeva teraviljasortidele (suvi- ja talinisu, oder) ning kohalikele laboritingimustele sobivate taimede ettekasvatusrežiimide ja koekultuurirežiimide väljatöötamine. Taimsete koekultuurimeetodite edukus on väga tugevasti mõjutatav kasutatavatest genotüüpidest ning laboratooriumi tingimustest. Seetõttu ei saa kasutada universaalseid meetodikaid vaid igale laboratooriumile tuleb kohandada oma unikaalsed meetodid.

Laboratooriumi sisustamiseks muretseti lisaks olemasolevatele seadmetele kesklaud, sterilisaator, pH-meeter, magnetsegajad, tsentrifuug ning laboratooriumi tööks vajalikud

kemikaalid ja instrumendid. Ehitati spetsiaalne box laminaarkapi jaoks ning valgusriiul regenereeruvate taimede kasvatamiseks. Laboratooriumi avati 19. mail 2004.a. Kuni 2006.a. septembrini oli tööde praktiliseks teostajaks TÜ biotehnoloogi haridusega Irina Puzõrjova, kes seejärel siirdus doktoriõpingutele Tartu Ülikooli Ökofüsioloogia töörühma. Topelthaplloidide tootmist jätkas seejärel Tartu Ülikooli bioloogi haridusega lõpetanud Terje Põvvat. Mõlemad töötajad läbisid väljaõppe ja koolituse Tallinna Tehnikaülikooli Geenitehnoloogia Instituudis. Uue töötaja tööleasumisel muudeti mõnevõrra nii nisul kui ka odral kasutatavaid laboratoorseid protokolle. Kogu projekti vältel on tulnud teha palju tööd ja kohandada kasutatavaid meetodeid kultuuride saastumise vähendamiseks.

SUVINISU

Doonortaimedena kasutati Jõgeva SAI suvinisu aretisi [**404** (Boj 10103 x NZ 26), **446** [Helle x Vinjett]; **453** (Triso x Helle), **455** [Triso x Manu]; **466** (Meri x SW 35098), **473** (Nandu x Boj 10102), **478** (Raisa x Mahti), **509** [Boj 10146(6 x Tjalve)]; **524** (Tähti/T. timophevii/Tähti x Meri)], **529** (SW 33129 x Manu), **586** [Tjalve x Arno]; **589** (Triso x Bor 25683) ja sorte **Baldus, Helle, Mahti, Manu, Tähti**.

Topelthaplloidide tegemiseks kasutati tolmuksinduktsiooni söötmena B söödet (KCl 1,49 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g L^{-1} , KH_2PO_4 0,14 g L^{-1} , mannitool 54,70 g L^{-1} ; pH 7,0), kus hoiti tolmuksind, et neist vabaneksid mikrospoorid.

Emakaid kasvatati samal ajal A2 söötmel: $\frac{1}{2}$ N6- makroelemendid (KNO_3 1'415 mg L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 83 mg L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 92,5 mg L^{-1} , KH_2PO_4 200 mg L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 231,5 mg L^{-1}), $\frac{1}{2}$ B5-mikroelemendid ja vitamiinid ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg L^{-1} , H_3BO_3 1,5 mg L^{-1} , KJ 0,375 mg L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00125 mg L^{-1} , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0125 mg L^{-1} , $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0125 mg L^{-1} , müo-inositol 50 mg L^{-1} , tiamiin-HCl 5,0 mg L^{-1} , nikotiinhape 0,5 mg L^{-1} , püridoksiin-HCl 0,5 mg L^{-1}), FeNa-EDTA 32 g L^{-1} , MES 200 mg L^{-1} , glutamiin 500 mg L^{-1} , maltoos 10'800 mg L^{-1} ; pH 6,2. Emakaid hoiti 4 päeva 26 °C ning tolmuksind sama kaua 33 °C juures.

Pärast induktsiooni eraldati gradienttsentrifuugimise teel elavad mikrospoorid surnutest ning asetati elavad mikrospoorid AMC söötmele (KNO_3 1'000 mg L^{-1} , KCl 35 mg L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 125 mg L^{-1} , KH_2PO_4 200 mg L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mg L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 4,4 mg L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mg L^{-1} , H_3BO_3 1,6 mg L^{-1} , KJ 0,8 mg L^{-1} , tiamiin-HCl 1,0 mg L^{-1} , FeNa-EDTA 32 mg L^{-1} , 2,4 – D 1,5 mg L^{-1} , kinetiin 0,5 mg L^{-1} , seriin 100 mg L^{-1} glutamiin 1'000 mg L^{-1} , maltoos 90'000 mg; pH 5,8], kuhu lisati ka A2 söötmel kasvatatud emakad, kuna katsed on näidanud, et emakad vabastavad söötmesse mikrospooride regeneratsiooni soodustavaid aineid. Seejärel asetati tassid 26 °C juurde kasvama kuni 30 päevaks.

Moodustunud embrüod asetati kasvama A2R söötmele, mis oli samasuguse koostisega kui A2 sööde, kuid suhkrute allikana oli maltoos asendatud 2%-lise sahharoosiga ning tardsöötme geelistajana oli kasutatud 0,3% Gelrite'i. Alguses kasvatati embrüoid Petri tassil ning kui embrüotest olid moodustunud taimed, istutati need kasvutuubidesse, mis sisaldas samuti AMC tardsöödet. Kasvutuubides lasti taimedel kasvada kuni nende pikkus oli ligikaudu 1 cm, pärast mida istutati need ümber mullapottidesse.

Hoolimata suurest hulgast katsematerjalist ei saanud topelthaplloidseid regenereerunud taimi. Põhjus, miks taimi ei saanud võib peituda valitud aretiste genotüüpilises mittevastuvõtlikkuses topelthaplloidide meetodikale, st neist ei saa topelthaplloide teha, kuid selleks, et olla selles täiesti kindel, tuleb valitud genotüüpidega katseid jätkata. Teine põhjus võib olla võimalus, et mikrospoorid said gradienttsentrifuugimise ajal kannatada, kuna tsentrifuugimiseks kasutati ühe faasina 0,58 M maltoosi ning teise faasina 0,3 M mannitooli (elusad mikrospoorid asetati kahe faasivahelisse kihti, kust need kokku korjati), sest vastavalt kirjandusele võib mannitool vähendada mikrospooride regeneratsioonivõimet.

Senise projekti tulemusena on jõutud eduka mikrospoorida ja embrüote moodustumiseni enamusel genotüüpidel, kuid raskuseks on olnud taimede regenereerumisel liialt suur albinootiliste taimede arv. Taimed albinootilisuse põhjus võib peituda kas regeneratsioonihäiretes või genotüübi sobimatutes topelthaploidide tegemiseks. Projekti jätkamisel seatakse põhieesmärgiks taimede albinootilisust põhjustavate tegurite väljaselgitamist ning likvideerimist, ning roheliste taimede arvu suurendamist.

Kasutatud liinidest kasvatati generatiivsed taimed ja saadi teri liinidelt **453, 473** ja **589**. Regeneratsiooniprotsessi edukalt läbinud liinidest **453, 473** ja **589** paljundati talveperioodil kasvuhuones 2. põlvkond.

TALINISU

Sama meetodikat, mida suvini sul kasutati ka talinisu sortide Sani, Ada, Lars ja Olivin topelthaploidsete taimede tootmiseks. Idandifaasis taimi vernaliseeriti 3 kuud külmkapis +3 °C juures, seejärel kasvatati talveperioodil kasvuhuones taimed generatiivfaasini. Kõigist sortidest saadi mikrospoorida arenenud embrüod, kuid embrüotest taimede regenereerimine ei õnnestunud.

ODER

Oder allub hästi haploidide meetodikale ning on seepärast valitud riisi kõrval selle meetodika mudelorganismiks teraviljade alal. Kuigi odrast on lihtne topelthaploide teha, esinevad siiski erinevate variatsioonide ja sortide vahel suured genotüüpidevahelised erinevused, mis tähendab seda, et iga genotüüp reageerib nii meetodikale kui ka söötmete koostisele erinevalt. Haploidide tootmiseks on kasutatud Jõgeva SAI aretisi (**4327, 4332, 4338, 4339, 4340, 4342, 4345, 4346, 4347, 4361, 4363, 4367, 4369, 4370, 4377, 4380, 4383, 4410, 4413, 4415, 4416, 4430**), selgitamaks nende reageerimist haploidide meetodile. Aretised moodustati kombinatsioonidena 14. erinevast genotüübist (Anni, Ansis, Catriona, Christina, Inari, Josefin, Luoke, Maaren, NFC Tipple, Tocada, Troon, 2985.11.9.5, 3254.10.3.14, 3291.6.12.2).

Üldlevinud meetod on, et mikrospoorida eraldamiseks lõigatakse odra pea kaheks-kolmeks tükiks ning purustatakse seejärel homogenisaatoris ning seejärel filtreeritakse mikrospoorida saadud „pudrust“ välja. Kuna see meetod tundus olevat üleliia robustne, sest toob endaga kaasa suure hulga mikrospoorida purunemise, otsustati eraldada tolmukad pintsettide teel „tik-tak“ meetodit kasutades ning sarnaselt nisuga hoida neid paar päeva FHG induktsioonisöötmele (FHGi) 33 °C juures. Seejärel eraldada elusad mikrospoorida surnutest ning asetada need siis kasvama samale söötmele ainult et seekord 26 °C juurde kuni embrüote moodustumiseni. Iga 12 – 14 päeva tagant lisatakse 1,5 mL FHGi söödet, et vältida toitainete puudulikkust. Moodustunud embrüod pannakse edasi kasvama FHG regeneratsioonisöötmele (FHGr) 26 °C juurde, kuni neist moodustuvad rohelised taimed, mis seejärel istutatakse mullapottidesse.

Odra topelthaploidide tegemiseks kasutati FHGi induktsioonisöödet, mille koostiseks oli: KNO₃ (1900 mg/L), NH₄NO₃ (165 mg/L), KH₂PO₄ (170 mg/L), CaCl₂ x 2H₂O (440 mg/L), MgSO₄ x 7H₂O (370 mg/L), FeNa-EDTA (37,5 mg/L), Gamborg B5-mikroelemendid (1000 mg/L), tiamiin-HCl (0,4 mg/L), müoinositol (100 mg/L), glutamiin (730 mg/L), maltoos (62,0 g/L) ja BAP (1 mg/L); pH 5,8. Mikrospoorida arenesid söötmele küll hästi, kuid elujõulisi embrüoid ei moodustunud.

Seega jäi ära kavandatud hilisem regeneratsioon söötmele FHGr – KNO₃ (1900 mg/L), NH₄NO₃ (165 mg/L), KH₂PO₄ (170 mg/L), CaCl₂ x 2H₂O (440 mg/L), MgSO₄ x 7H₂O (370 mg/L), FeNa-EDTA (37,5 mg/L), Gamborg B5-mikroelemendid (1000 mg/L), tiamiin-HCl (0,4 mg/L),

müoinositol (100 mg/L), maltoos (31,0 g/L), IAA (0,5 mg/L), BAP (1 mg/L) ja Gelrite (3,0 g/L); pH 5,8.

Ühegi külvi korral ei jõutud odral mikrospooride arengust kaugemale, st ei ole saadud embrüoid. Kuigi mikrospoorid arenevad normaalselt, ei lähe nad üle regeneratsioonifaasi. Meie ebaõnnestumise arvatavad põhjused võivad olla odrapeade lõikuses vales arenguetapis ja meetodilised erinevused (valgusrežiimi, söötmete koostise ja +4 °C juures hoidmise aja erinevustes).

KARTULI MIKROPALJUNDUS

Kasutati kartuli-lehemädaniku differentsiaatorsortide meristeemseid katseklaasitaimi (11 genotüüpi). Kartulimeristeemide kasvatamiseks kasutati modifitseeritud MS (Murashige & Skoog) söödet (MSm), kus MS vitamiinid olid asendatud Gamborg B5 söötme vitamiinidega ning jäeti lisamata gibrelliinhape, et vähendada võimalike mutatsioonide teket.

Mikrotaimed paljundati ning istutati katseklaasidesse MSm söötmele ja kasvatati fotoperioodil 16 tundi päev/8 tundi öö temperatuuril 20 – 23 °C. Klooniid juurdusid valitud söötmel kiiresti (5 – 14 päeva). Sõltuvalt klooniid kasvukiirusest, istutati need 14 – 21 päeva pärast ümber värsketele söötmele.

Vastavalt kirjandusele saab kartulit sundida moodustama mikromugulaid asetades need kas pimedasse temperatuurile 16 – 18 °C ligikaudu kaheks kuuks; istutada need ümber spetsiaalsele tuberisatsioonisöötmele või siis kasvatada katseklaasis samades tingimustes nagu induktsioonigi korral ainult selle erinevusega, et klooniid jäetakse uuele söötmele ümber istutamata, et tekitada söötmes mikro- ja makroainete puudus, nn „toitainenälg“. Meie laboris prooviti eelmainitud meetoditest kahte: meristeemide asetamist pimedasse ning „näljutamist“. Meie tingimustes pimedas mugulad ei moodustunud, vaid moodustusid ainult „näljatingimustes“. Samuti ilmses, et osad genotüübid (R1, R3, R4) annavad kiiresti 3-5 mm läbimõõduga mikromugulaid, samas kui teised neid praktiliselt ei moodusta või võtab see neil kauem aega (R10, R11).

Modifitseeritud MS söötmel moodustasid kõige paremini mugulaid genotüübid R2 ja R7 (8 mugulat) ning kõige vähem R1, R3 ja R11 (2 mugulat). Kõigi genotüüpide kekmisena moodustus 4,6 mikromugulat katseklaasi kohta. Järgneval aastal arenesid kõigist mikromugulatest normaalsed kartulitaimed.

11. LÜHIKOKKUVÕTE (Summary - kokkuvõte inglise keeles kuni 2 lk) Implementation of methods of tissue culture in plant breeding practice

The objectives of the research project were:

Establishment of the tissue culture laboratory and introduction of double haploid methods in the breeding practice at the Jõgeva Plant Breeding Institute. The goals of our research project have been finding the right methods for production of double haploids in wheat and barley; and production of microtubers in potato tissue culture. The current work is directed into development of laboratory protocols for production of doubled haploid plants in means of microspore culture in spring and winter wheat and in spring barley. The work is directed into the further implementation of molecular breeding methods in the breeding practice of Jõgeva Plant Breeding Institute.

Most successful has been project in production of doubled haploids by microspore culture in spring wheat, where generative plants have been regenerated from several genotypes. The limitation has been the high rate of albinotic plants. The studies in winter wheat have resulted with production of developed embryos, but the propagation stopped without production of regenerated plants. During 14 days of cultivation the microspores were formed from extracted spring barley pollen, but they did not develop into embryos. As a side co-project - microtubers were successfully produced from 11 potato genotypes in modified MS growing media. Produced microtubers regenerated into healthy plants in the following season.

12. PROJEKTIGA HAAKUVAD TEADUSTEEMAD, GRANDID, DOKTORI- JA MAGISTRITÖÖD, JÄRELDOKTORITE UURIMISTEEMAD, LEPINGUD, PATENDID:

Sihtfinantseeritav teema: “Säästva põllumajanduse tarbeks aretatavate põllukultuuride sortide saagikuse, saagi kvaliteedi ja haiguskindluse vahelised seosed ja parandumine”.

13. KOOSTÖÖ (lepingud, konverentside korraldamine, töötamine välisriikides jne):

Projekt on toimunud tihedas koostöös projektiga Molekulaarsete ja koekultuurimeetodite rakendamine sordiaretuses ja taimse materjali analüüsis (projekti juht K. Järve (EBI/TTÜ Geenitehnoloogia Instituut)

Korraldati rahvusvaheline teadusseminar Biotehnoloogia meetodid sordiaretuses (Jõgeva, 5.03.2004) kus esineti kahe ettekandega. Puzõrjova, I. Topelthaploidide kasutamine sordiaretuses. Koppel, M. Sordiaretuse hetkeseis ja tulevikusuundumused.

Algatati Balti riikide ühisprojekt - Mapping of QTL's for local adaptation in various spring barley genotypes with Nordic and Baltic origin (juht prof I.Rashal Läti Ülikool).

14. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:

I. Puzõrjova. 2005. Koekultuuri meetodite rakendamine sordiaretuses. Annamaa, K. (Toimetaja) Sordiaretus ja seemnekasvatuse IX. ISSN 1736-2881, lk. 205-215.

| | | |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| 15. Teema juht (ees- ja perekonnanimi): | Allkiri: Mati Koppel | Kuupäev: 27.02.2008 |
| Tellijä esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (ees- ja perekonnanimi): | Allkiri: Mati Koppel | Kuupäev: 27.02.2008 |

Täidab põllumajandusteaduste nõukogu

| | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| Nõukogu esimees: | Allkiri: | Kuupäev: |
|-------------------------|-----------------|-----------------|

Põllumajandusteaduste nõukogu hinnang tehtud tööle: