РАЗДЕЛ V. БИОТЕХНОЛОГИИ

Муравлев А.А., Чеснокова Е.В., Колычева Ю.А.

Получения андроклиных линий ярового рапса (*Brassica Napus L.*)ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт рапса
(Россия, Липецк)

doi: 10.18411/lj-08-2020-21

idsp: ljjournal-08-2020-21

Аннотация

Изучали андрогенез пыльников *in vitro* 8 образцов ярового рапса. Все изучаемые образцы формировали эмбриониды. Интервал частоты отзывчивых пыльников составил от 0,09 до 11,8 %. Максимальное количество 126 эмбрионидов получено у 2 образца. Пыльники ярового рапса, культивируемые на инициальной питательной среде формировали эмбриониды разных стадий развития – глобулярная, сердцевидная, торпедовидная, семядольная и полиэмбрионидная. Полученные эмбриониды имели разную способность формировать растения. Культивирование семядольных эмбрионидов, ненормальных стеблей на питательной среде В5 с добавлением регуляторов роста: 6-БАП в концентрации 0,2 мг/л, НУК – 0,1 мг/л и кинетина – 1,0 мг/л увеличило индукцию вторичных эмбрионидов и в дальнейшем количество растений.

Ключевые слова: рапс, андроклинные линии, эмбриониды, регенерация растений.

Abstract

Anther androgenesis of 8 spring rapeseed samples has been studied *in vitro*. All of the studied samples formed embryoids. Frequency range of responsive anthers was from 0,09 to 11,8 %. The maximum number of 126 embryoids was obtained in the 2d sample. Spring rape anthers, cultured in initial nutrient medium, formed embryoids of various developmental stages - globular, heart-shaped, torpedo-shaped, cotyledon and polyembryoid. The ability to form plants varied within the obtained embryoids. Culturing cotyledon embryoids, abnormal stems in the nutrient medium B5 with growth regulators addition: 6-BAP in 0,2 mg/l concentration, NAA - 0,1 mg/l and kinetin -1,0 mg/l, increased secondary embryoid induction and further the number of plants.

Keywords: rapeseed, androclinic lines, embryo, regeneration plant.

Успех в селекции сельскохозяйственных культур, в значительной мере, связан с поиском нового исходного материала. Он должен обеспечивать расширение генетической изменчивости, с одной стороны, и стабильность, с другой. Таким требованиям отвечают удвоенные гаплоидные формы, полученные с использованием методов культуры пыльников и микроспор.

Важным фактором, влияющим на индукцию эмбрионидов в культуре пыльников, является генотип донорного растения. Это было подтверждено у всех видов *Brassica*, с которыми проводили исследования в культуре пыльников и микроспор [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Даже внутри одного генотипа есть существенные различия между отдельными растениями [7]. Также на выход эмбрионидов оказывает влияние взаимодействие генотипа с условиями окружающей среды [6, 8, 9]. У *Brassica oleracea* convar. capitata L. (Alef.) выращенные в поле растения были более отзывчивы, чем растения, выращенные в тепличных условиях [9]. Это говорит о том, что некоторым генотипам требуются определенные условия выращивания для формирования эмбриогенных

микроспор. Влияние генотипа проявляется в частоте эмбриоидогенеза, качестве эмбриоидов и регенерации растений [2, 5, 10, 11].

Поиск оптимальных условий регенерации растений в культуре пыльников *in vitro* ярового рапса является актуальной

Методика исследований

Донорные растения 8 образцов выращивали в полевых условиях. Бутоны, собирали в течение всего периода цветения растений, начиная с появления первых цветков на растении. Пыльники вводили в культуру в день сбора. Стерилизацию проводили в 70 % спирте-ректификате 30-60 секунд, затем в 7 % водном растворе «Domestos» в течение 7-10 минут. Бутоны полоскали 3-4 раза в стерильной дистиллированной воде.

Отбирали бутоны рапса размером от 2,5 до 3,0 мм, длина лепестков равна половине длины бутонов, окраска пыльников – светло-зелёная. Изолирование пыльников и введение их в культуру проводили в асептических условиях. Культивировали пыльники на питательной среде В5 Гамборга в модификации Келлера и Армстронга [12] с добавлением 10 % сахарозы, 8,0 грамм агар-агара, 800 мг/л глютаминовой кислоты, 100 мг/л серина. В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д – 0,1 мг/л, НУК – 0,1 мг/л.

После изолирования пыльников из бутонов проводили термическую обработку при 30° С в течение 7 суток в темноте, затем переносили их и продолжили культивирование при 25° С. Полученные эмбриониды переносили на свет для образования хлорофилла, затем пересаживали в пробирки на среду МС (Murashige, Skoog) [13], содержащую 1 % сахарозы, без регуляторов роста.

Температура культивирования эмбриоидов и проростков в режиме 25° С при круглосуточном освещении. После образования корней и 3-4 листьев проростки пересаживали в почву и накрывали их пластиковыми стаканами.

В фазу цветения определяли плоидность регенерантов. С каждого гаплоидного растения нарезали 10 черенков таким образом, чтобы на черенке находилась пазушная точка роста. Затем их помещали в стакан с водным раствором колхицина в концентрации 0,5 % и ставили на 18 часов в термостат (24 – 26° С) с последующим промыванием водопроводной водой в течение 2 часов. Для укоренения черенков использовали пасту, содержащую 0,1 % ИМК (индолмасляная кислота), тальк и ДМСО (диметилсульфоксид). Пасту наносили на новый срез черенка и высаживали в почву, накрывая пластиковым стаканом.

Результаты исследований

В таблице представлены результаты культивирования пыльников *in vitro* на искусственных питательных средах. Все изучаемые образцы формировали эмбриониды. Интервал частоты отзывчивых пыльников составил от 0,09 до 11,8 %.

Максимальная индукция эмбриоидов 11,8 % получена у пыльников образца № 2. Различия между лучшим образцом и образцом № 1 по частоте отзывчивости пыльников достоверны. Нет существенных различий между образцами 1 и 190, у которых частота андрогенеза составила 6,9 и 6,4%, соответственно. Образцы 186, 187, 188 и 189 формировали эмбриониды с низкой частотой – от 0,7 до 0,9 %.

Таблица

Андрогенез пыльников *in vitro* образцов ярового рапса

Номер образца	Количество, шт.			Частота, %	
	культивируемых пыльников	эмбриоидов	растений	андрогенез а	регенерации растений
1	763	53	84	6,9	158,5
2	1070	126	120	11,8	95,2
185	1045	1	0	0,09	0
186	1218	10	5	0,8	50,0
187	1486	14	6	0,9	42,8

188	463	4	1	0,86	25,0
189	1830	13	10	0,7	76,9
190	721	46	28	6,4	60,8
Всего	8596	267	254	3,1	95,1
НСР _{0,05}				1,25	

В наших исследования выявлены нарушения в регенерации растений из эмбриоидов. Аналогичные результаты получены у других авторов, работавших с капустными культурами: *Brassica campestris* (*B. rapa*) L. [15], *B. napus* L. [16], *B. nigra* Koch [17].

На инициальной питательной среде пыльники ярового рапса формировали эмбриониды разных стадий развития – глобулярная, сердцевидная, торпедовидная, котиyledонная (семядольные). И разновидность глобулярного – полиэмбрионидный тип (рис. 1).

Анализ регенерационной способности эмбриоидов показал, что не все типы (стадии, фазы) развития эмбриоидов способны формировать растения с высокой частотой. В зависимости от генотипа на регенерационной среде погибает до 50 % эмбриоидов [14]. Случайное формирование полиэмбриоидов из микроспор позволило увеличить получение с одной структуры до трёх и более пробирочных растений. Частота регенерации растений, как и способность к эмбриогенезу зависит от генотипа образца (табл.).

Рисунок 1 – Эмбриониды разной стадии развития: пл – полиэмбрионид, гп – глобулярный, см – семядольный, ср – сердцевидные.

Из культивируемых пыльников второго образца получено 126 эмбриоидов, которые формировали 95,2 % растений-регенерантов. Максимальная частота регенерации растений 158,5 % получена у образца № 1. Частота регенерации растений была увеличена за счёт использования микроклонального размножения и культуры вторичных эмбриоидов. Вторичные эмбриониды получили на среде с добавлением цитокининов, которые формировались как на первичных эмбриоидах, так и на частях стебля, взятых от ненормально развивающихся проростков (рис 2).

Для микроклонального размножения использовали эмбриониды глобулярного типа, которые пересаживали на питательную среду В5 с добавлением регуляторов роста: 6-БАП в концентрации 0,2 мг/л, НУК – 0,1 мг/л и кинетин – 1,0 мг/л. Образовавшийся каллус делили на кусочки и культивировали до появления зелёных зон – от 1 до 3 штук, которые в дальнейшем формировали проростки (рис 3). Хорошо

развитые растения осторожно вынимали из пробирок, срезали каллусную ткань и пересаживали для образования корней на среду В5, не содержащую фитогормонов.

Рисунок 2 – Развитие вторичных (соматических) эмбрионов ярового рапса: а – на первичном эмбрионе, б – на стебле проростка

Рисунок 3 – Микроклональное размножение ярового рапса.

Первичные эмбриониды (сердцевидные, торпедовидные), культивируемые на безгормональной питательной среде, формировали нормальные пробирочные растения рапса в течение полутора – двух месяцев (рис 4).

Рисунок 3 – Регенерация растений из эмбриоидов: а – проросток с семядолями и настоящим листочком, б – пробирочное растение.

Большинство эмбриоидов семядольной стадии отличались ненормальным развитием в проростки (утолщение стебля, срастание семядолей, нарушение геотропизма) (рис 4).

Рисунок 4 – Нарушение геотропизма при регенерации растений: кр – корень, лс - лист.

Таким образом, результаты наших исследований показали возможность значительного увеличения числа растений-регенерантов за счёт культивирования не только первичных, но и вторичных эмбриоидов, а также микроклонального размножения. С помощью культуры пыльников *in vitro* созданы гомозиготные линии, которые являются ценным исходным материалом для селекции ярового рапса.

1. Arnison, P.G. Genotype – specific response of cultured broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) anthers to cytokinins. / P. G. Arnison, P. Donaldson, A. Jackson, C. Semple, W. A. Keller // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1990. – V. 20. – P. 217-222.

2. Arnison, P. G. A survey of the anther culture response of *Brassica oleracea* L. cultivars grown under field conditions. / P. G. Arnison, W. A. Keller // *Plant Breed.* – 1990. – V. 104. – P. 125-133.
 3. Baillie, A. M. K. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. / A. M. K. Baillie, D. J. Epp, D. Hutcheson, W. A. Keller // *Plant Cell Rep.* – 1992. – V. 11. – P. 234-237.
 4. Cardy, B. J. Production on anther-derived doubled haploids for breeding oilseed rape (*Brassica napus* L.). / B. J. Cardy // Ph.D. Thesis, University of Guelph, Ontario – 1986.
 5. Chuong, P. V. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. / P. V. Chuong, C. Deslauriers, L. S. Ott, W. D. Beversdorf // *Can. J. Bot.* – 1988. – V. 66. – № 8. – C. 1653-1657.
 6. Dunwell, J. M. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. / J. M. Dunwell, M. Cornish, A. G. L. Decourcel // *J. Exp. Bot.* – 1985. – V. 36. – № 165. – P. 679-689.
 7. Ockendon, D. J. Anther cultures in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). II. Effect of genotype on embryo yields. / D. J. Ockendon // *Ann. Appl. Biol.* – 1985. – V. 107. – P. 101-104.
 8. Thurling, N. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. / N. Thurling, P. M. Chay // *Annals of Botany*. – 1984. – V. 54. – № 5. – P. 681-693.
 9. Roulund N. N. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* Alcf.). / N. N. Roulund, L. Hansted, S. B. Anderson, B. Farestveit // *Euphytica*. – 1990. – P. 237-242.
 10. Duijs J. G. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. / J. G. Duijs, R. E. Voorps, D. L. Vissel, J. B. M. Custers // *Euphytica*. – 1992. – V. 60. – P. 45-55.
 11. Kieffer, M. Anther cultures of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C. Aief.). / M. Kieffer, M. P. Fuller, J. E. Chauvin, A. Schlessner // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1993. – V. 33. – P. 303-313.
 12. Keller, W.A. High frequency of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. / W.A. Keller, K.C. Armstrong // *Z. Pflanzen-zuchtg.* – 1978. – 80. – P. 100-108.
 13. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. / T. Murashige, K C. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15 – P. 473-497.
 14. Муравлев, А.А. Культура пыльников в селекции рапса. Автореф. дис. ... кандидата биологических наук – Саратов – 2007 г. – 24 с.
 15. Keller, W. A. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. / W. A. Keller, T. Rajhathy, J. Lacapra // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1975. – V. 17. – P. 655-666.
 16. Keller W. A., Armstrong K. C. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. / W. A., Keller, K. C. Armstrong // *Can. J. Bot.* – 1977. – V. 55. – P. 1383-1388.
 17. Govil S. Plant regeneration from in vitro cultured anthers of black mustard (*Brassica nigra* Koch). / S. Govil, S. B. Babbar, S. C. Gupta // *Plant Breed.* – 1986. – V. 97. – № 1. – P. 64-71.
-