

УДК 635.33:581.33:581.4

ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ГЕНОТИПОВ РОДА *BRASSICA* В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*

А.И. Минейкина

ФГБНУ ФНЦО, Одинцово, Россия

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH) стала мощным инструментом фундаментальных и прикладных исследований растений. Основным и рутинным использованием DH-технологии является производство чистых линий в селекционном процессе для получения гибридов. Успешность применения таких биотехнологических подходов заключается в высоком уровне эффективности протоколов культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Для технологии культуры изолированных микроспор *in vitro* основополагающими являются процессы индукции эмбриогенеза и регенерации растений из эмбриоидов. В результате работы нами были изучены и модифицированы основные факторы, влияющие на эти процессы, для повышения выхода эмбриоидов у изученных генотипов растений рода *Brassica*.

Ключевые слова: DH-технология, удвоенные гаплоиды, культура микроспор *in vitro*, капустные культуры, андрогенез, индукция эмбриогенеза, факторы эмбриогенеза.

Введение. Ускоренное создание новых и совершенствование существующих сортов и гибридов сельскохозяйственных растений является одним из стратегических направлений научной деятельности в области продовольственной безопасности государства. Культура изолированных микроспор *in vitro* является одной из передовых технологий, которая позволяет ускорить селекционный процесс за счет быстрого получения гомозиготных линий – удвоенных гаплоидов [6,8]. Первые успешные исследования в культуре микроспор капустных культур были проведены в начале 1980-х годов [9]. Затем был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой DH технологии для растений рода *Brassica* [13]. Затем данный протокол с небольшими модификациями стали использовать для получения удвоенных гаплоидов у других растений рода *Brassica*: капусты белокочанной, краснокочанной, цветной, португальской, листовой, брокколи, кольраби и капусты китайской [7,17,15,16,11,18].

В мировой практике было реализовано множество стратегий для повышения эффективности технологии получения удвоенных гаплоидов у капустных культур. Такие факторы, как условия выращивания донорных растений, генотип, стадия развития микроспор [10,3,5], тип предобработки бутонов и микроспор [14], состав питательных сред, условия культивирования [8] являются объектами постоянных исследований и модификаций. Среди многих факторов, обуславливающих эффективную индукцию микроспор, одним из важнейших являются стрессовые условия. Такие факторы способствуют перепрограммированию развития микроспор с гаметофитного на спорофитное с образованием эмбриоидов [2]. Однако точные механизмы действия таких факторов не установлены.

Как видно из результатов ранних исследований, успешность применения биотехнологических методов требует эффективного и надежного протокола. Поскольку многие авторы отмечают высокую генотипическую специфичность, такой протокол необходимо адаптировать под определенный вид, сорт, генотип.

Материалы и методы. В работе использовали генотипы растений рода *Brassica* лаборатории селекции и семеноводства капустных культур ФГБНУ ФНЦО. Донорные растения выращивали в полевых условиях. Яровизацию проводили при температуре 6-10°C в течение 2 месяцев. Для получения цветоноса растения переносили в камеры искусственного климата с использованием натриевых ламп высокого давления 6000 лк со световым режимом 16 ч. - день/ 8 ч. – ночь при температуре 19°C. Бутоны были отобраны вначале цветения донорных растений. Отбор бутонов, определение стадии развития микроспор и их изолирование проводили с

использованием методики культивирования микроспор семейства *Brassicaceae*, разработанной ранее в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО с небольшими модификациями [1].

Для культивирования использовали жидкую питательную среду NLN-13 с 13%-ной сахарозой с рН 5,8-6,4 [9]. Шоковую температурную обработку проводили при 32°C в темноте с различной временной экспозицией от 1 до 3 суток. Далее микроспоры культивировали при 25°C непрерывно в темноте в термостате с платформой-шейкер до образования эмбриоидов. По мере достижения эмбриоидов семядольной стадии развития их переносила в культуральные сосуды с твердой питательной средой MS [12] с 2%, сахарозой, 0,7% агаром, рН 5,8. Для повышения регенерационной способности в среду добавляли 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК. Культивирование проводили на стеллажах при смешанном освещении двух типов люминесцентных ламп: OSRAM Fluora L36W/77 (преимущественно синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (преимущественно белого спектра), при суммарной освещенности 3000 люкс при 16 ч днем/8 ч ночью и 24 ± 2 °С. Укорененные побеги с 5–6 листьями высаживали в горшки объемом 1 л со смесью торфа и перлита (7:3) и накрывали пластиковыми стаканчиками с перфорацией на 10 суток, чтобы дать возможность устьицам адаптироваться к пониженной влажности. Горшки помещали в камеру выращивания при 21°C, фотопериоде 16 часов – день/8 часов – ночь и освещенности 6000 лк. Статистический анализ произведен с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Результаты

1. Стадия развития микроспор

Для капустных культур стадия развития микроспор является решающим фактором успешного эмбриогенеза. Микроспоры на поздней одноядерной стадии и ранняя двухклеточная пыльца под воздействием стрессовых факторов способны переключать гаметофитный путь развития на спорофитный с образованием гаплоидных эмбриоидов (Рис. 1). Ввиду морфологических различий строения и размеров бутонов у различных видов капустных культур, соответственно, и стадии развития микроспор в бутонах одной длины будут различны. У капусты белокочанной отмечены наибольшие размеры бутонов, содержащие компетентные к эмбриогенезу микроспоры. Преимущественно из бутонов длиной 4,5-5,5 мм было получено наибольшее количество эмбриоидов. Для *B. rapa*, *B. napus* и *B. juncea* параметры длины бутона существенно меньше (Рис.2).

2. Температурная обработка микроспор

Инкубация микроспор при 25°C не способствовала инициации развития микроспор по спорофитному пути. Только применение кратковременного температурного шока при 32°C позволило достичь выхода эмбриоидов. Предварительная холодовая температурная обработка бутонов в течение 1 суток положительно влияла на повышение индукционного ответа во всех отзывчивых генотипах. Существенное влияние на количество эмбриоидов оказала временная экспозиция высокотемпературной обработки. Для *B. oleracea* и *B. rapa* при продолжительности температурного шока в течение 24-48 ч отмечен наибольший выход эмбриоидов (Табл.1).

Таблица 1

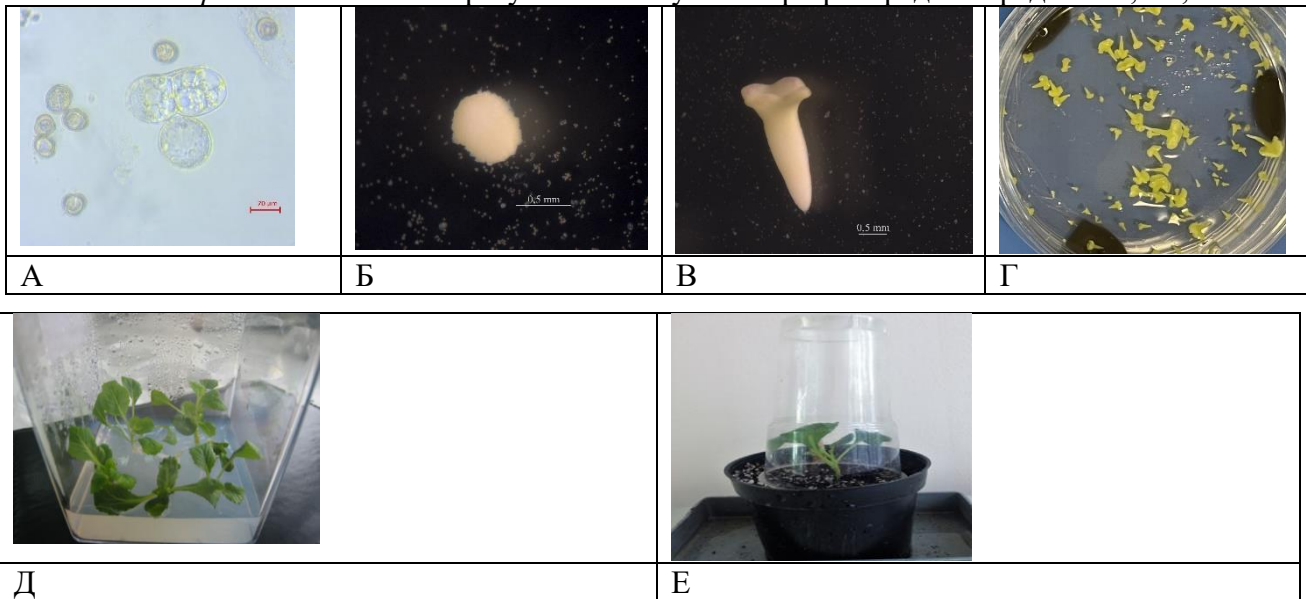
Выход эмбриоидов в зависимости от продолжительности температурной обработки микроспор в культуре *in vitro* у растений *B. oleracea* и *B. rapa* (шт./чашку Петри)

Вид	Селекционный № генотипа	25°C (среднее±SE)	Продолжительность температурной обработки при 32°C, час. (среднее±SE)		
			24	48	72
<i>B. oleracea</i> <i>var. cap.</i>	173	0,00±0,00a	40,67±3,84b	257,33±21,67c	0,00±0,00a
	116	0,00±0,00a	55,00±5,13c	83,00±9,76d	13,33±3,18b
	45	0,00±0,00a	0,00±0,00a	9,50±3,57b	0,00±0,00a
	142	0,00±0,00a	0,33±0,21b	120,00±5,00d	40,33±9,02c
	145	0,00±0,00a	126,47±10,27d	69,50±8,29c	45,75±9,83b
<i>B. rapa</i>	1	0,00±0,00a	9,20±1,36b	11,75±3,43b	0,00±0,00a
	4	0,00±0,00a	249,40±18,91c	49,75±7,42b	0,00±0,00a
	6	0,00±0,00a	121,33±15,066c	14,60±2,86b	0,00±0,00a

Значения в строке внутри генотипа, за которыми следует одна и та же строчная буква, существенно не отличаются, согласно множественному критерию Дункана.

3. Влияние pH питательной среды

Манипуляция со значением pH среды NLN-13 в пределах 5,6-6,6 для различных генотипов капустных культур представляет эффективный и общедоступный способ повышения выхода эмбриоидов. По результатам наших исследований показано, что для капусты белокочанной, цветной, брокколи и рапса наиболее оптимальным является значение pH 5,8-6,0. Для *B. juncea* наибольший выход эмбриоидов достигнут на питательной среде с pH 6,1. А для некоторых генотипов *B. rapa* положительные результаты получены при pH среды в пределах 6,4-6,6.



3.4. Влияние экзогенных гормонов в составе питательной среды

Применение экзогенных регуляторов роста в составе индукционной питательной среды в культуре микроспор *in vitro* не является обязательным требованием для эмбриогенеза. Однако, по результатам исследований с непокорными генотипами применение гормонов способствует выходу эмбриоидов. Для капустных культур преимущественно ауксины и цитокинины способствуют эффективному эмбриогенезу. В наших исследованиях для видов *Brassica* наибольшему выходу эмбриоидов способствовали: кинетин в концентрации 2 мг/л, зеатин в концентрации 1 мг/л и их сочетание с индолилуксусной кислотой (IAA) в концентрации 0,1-0,2 мг/л. Использование 6-бензиламинопурина в концентрации 1-2 мг/л в сочетании с IAA и гиббериллиновой кислотой эффективно влияло на регенерацию и образование адвентивных побегов из эмбриоидов на твердой питательной среде MS.

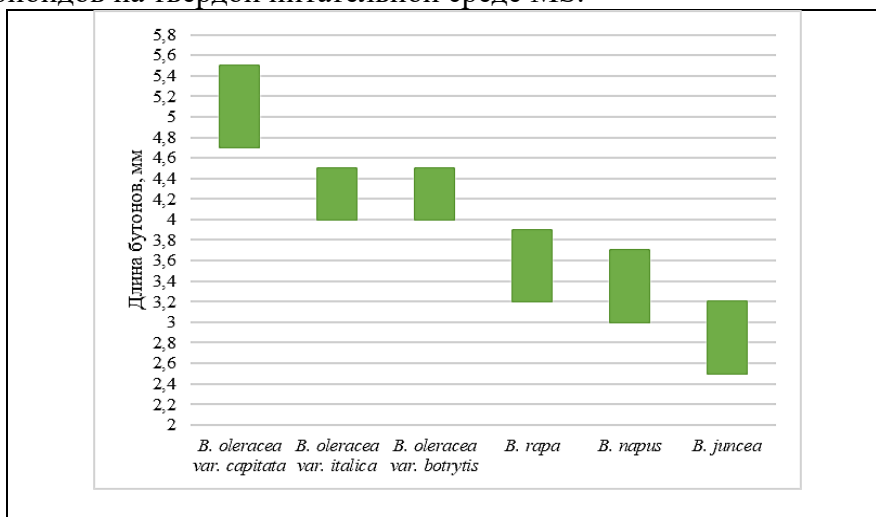


Рисунок 2. Диапазон длины бутонов, способных к эмбриогенезу у рода *Brassica*

Заключение. В результате изучения факторов и подбора оптимальных параметров успешной индукции эмбриогенеза в культуре микроспор *in vitro* у различных представителей рода *Brassica* удалось достичь максимального выхода эмбриоидов у отдельных генотипов. Решающими факторами являются: оптимальная стадия развития микроспор, высокотемпературная обработка при 32°C, кислотность питательной среды и её гормональный состав.

Библиографический список

1. Домблидес Э.А.; Шмыкова Н.А.; Шумилина, Н.А.; Заячковская Т.В.; Минейкина, А.И.; Козар Е.В.; Ахраменко В.А.; Шевченко Л.Л.; Кан, Л.Ю.; Бондарева Л.Л.; Домблидес, А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культурах микроспор семейства Brassicaceae (методические рекомендации). Москва. 2016. С. 40.
2. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015, 19(1), 111-120.
3. Baillie A.M.R., Epp D.J., Hucheson D., Keller W.A. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep. 1992, 11, 234-237.
4. Bhatia R., Dey S.S., Sood Sh., Sharma K., Chander P., Kumar R. Efficient microspore embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) for development of plants with different ploidy level and their use in breeding programme. Scientia Horticulturae. 2017, 216(3), 83-92.
5. Bhowmik P., Dirpaul, J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: Influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011, 106, 359–362
6. Devaux P., Pickering R. Haploids in the improvement of *Poaceae*. In C.E. Palmer et al. (ed.); Haploids in crop improvement II. Springer-Verlag: Germany, Berlin, 2005, 215–242.
7. Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers, J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica, 1992, 60, 45-55.
8. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. J. Plant Biotech, 2010, 8, 377-424.
9. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollens of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 1982, 105, 427–434.
10. Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. Plant Breed. 1989, 103, 119-123.
11. Mineykinina A.I, Bondareva L.L, Soldatenko A.V, Domblides E.A. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture *in vitro*. Plants. 2021, 10, 1950.
12. Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plant* 1962, 15, 473–497.
13. Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.*, 1988, 74, 377-384.
14. Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of pre-prophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*. 1999, 208, 383–391
15. Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 2011, 107, 305-315.
16. Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.M., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 2012, 110, 69-76.
17. Zhang W., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*. 2008, 117(1), 69-72.
18. Zou J., Zou, X., Gong Z., Song G., Ren J., Feng H. Thidiazuron Promoted Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). *Horticulturae*. 2023, 9, 327.