

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 °C. 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

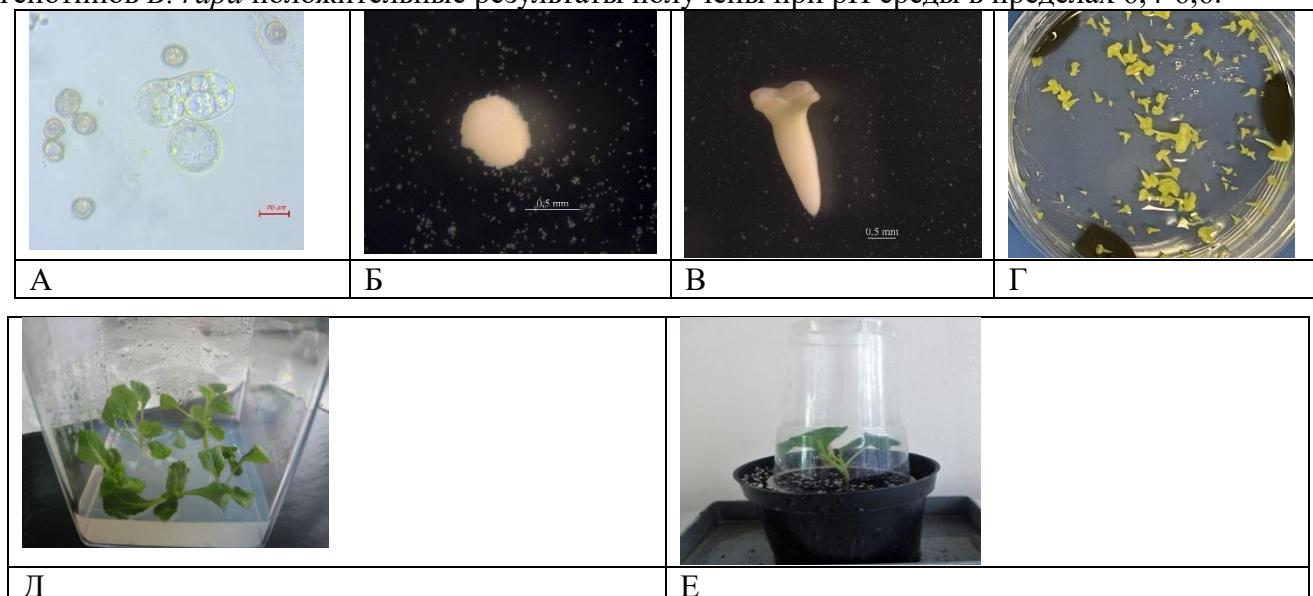
Выход эмбриоидов в зависимости от продолжительности температурной обработки микроспор в культуре *in vitro* у растений *B. oleracea* и *B. rapa* (шт./чашку Петри)

Вид	Селекционный № генотипа	25°C (среднее±SE)	Продолжительность температурной обработки при 32°C, час. (среднее±SE)		
			24	48	72
<i>B. oleracea</i> var. <i>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 Дунканна.

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 исследований 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.

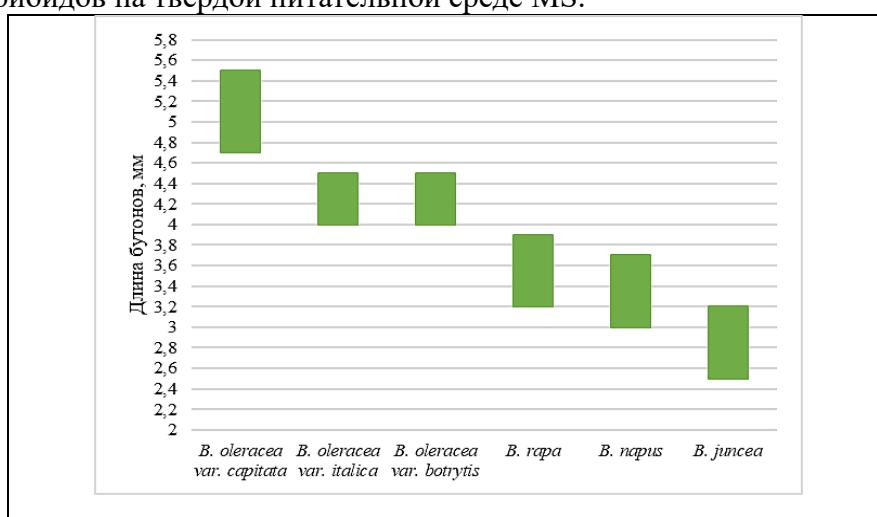


Рисунок 2. Диапазон длины бутонов, способных к эмбриогенезу у рода *Brassica*

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. Домбладес 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.; Домбладес, 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. Licher R. Induction of haploid plants from isolated pollens of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 1982, 105, 427–434.
10. Licher R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. Plant Breed. 1989, 103, 119-123.
11. Mineykina 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.