УДК 582.683.2:578.083 **DOI: 10.36718/1819-4036-2021-7-66-72**

Екатерина Викторовна Чеснокова
Липецкий научно-исследовательский институт рапса – филиал Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта», младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса, Липецк, Россия, e-mail: catc4es@yandex.ru
Анатолий Анатольевич Муравлев
Липецкий научно-исследовательский институт рапса – филиал Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта», ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса, кандидат биологических наук, Липецк, Россия, e-mail: anatoly.muravleff@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ *IN VITRO* НА ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ ЯРОВОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)

Цель исследования – изучение влияния стадии развития (размеров), времени обработки бутонов пониженными положительными температурами и генотипа донорного образца на дедифференциацию каллуса из неопыленных семязачатков ярового рапса. Задачи исследования: ввести в культуру in vitro изолированные семязачатки и определить частоту дедифференциации эксплантов на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 2,4-Д (2-4 дихлорфеноксиуксусная кислота) и кинетина по 5,0 мг/л. В качестве объектов исследования использовали неопыленные семязачатки восьми гибридных образцов ярового рапса. Образцы 1 и 2 формировали каллусную ткань с частотой 2,6 и 2,5 % соответственно. Семязачатки, изолированные из бутонов изучаемых размеров (2,0; 4,0; 6,0 мм), отличались частотой дедифференциации каллуса от 11,59 до 16,95 %. Семязачатки, изолированные из бутонов размером 6,0 мм, были наиболее компетентны к каллусообразованию и формировали каллус с максимальной частотой 16,95 %. Обработка соцветий в течение 24, 36 и 60 ч пониженными температурами 4±1 °С не оказывает положительного влияния на формирование каллусной ткани из семязачатков. Частота дедифференциации снижается с 7,29 % без обработки бутонов до 1,24 % при 60-часовой обработке. Результаты культивирования семязачатков на инициальной питательной среде показали, что частота дедифференциации у изучаемых генотипов ярового рапса варьировала от 0,2 (обр. 188) до 2,6 % (обр. 1). Семязачатки, изолированные из донорных растений, полученных с использованием культуры тканей, индуцировали каллусную ткань с частотой 15,57 %. Вторичные структуры и проростки получили на среде MS с добавлением 6-БАП (6-бензиламинопурин) – 0,5 мг/л и кинетина – 3,0 мг/л. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии предобработки, размера бутонов и генотипа донорного растения на частоту дедифференциации семязачатков ярового рапса.

***Ключевые слова**: питательная среда, генотип, неопылённые семяпочки, семязачатки, каллусообразование.*

Ekaterina V. Chesnokova
Lipetsk Rapeseed Research Institute – a branch of the All-Russian Research Institute of Oilseeds after V.S. Pustovoit, a junior researcher at the Rapeseed Biotechnology Laboratory, Lipetsk, Russia, e-mail: catc4es@yandex.ru

© Чеснокова Е.В., Муравлев А.А., 2021
Вестник КрасГАУ. 2021. № 7. С. 66–72.

Anatoly A. Muravlev
Lipetsk Rapeseed Research Institute – a branch of the All-Russian Research Institute of Oilseeds after V.S. Pustovoit, leading researcher at the Rapeseed Biotechnology Laboratory, candidate of biological sciences, Lipetsk, Russia, e-mail: anatoly.muravleff@yandex.ru

SOME TECHNOLOGICAL ASPECTS IN VITRO IMPACT ON SPRING RAPESEED (*BRASSICA NAPUS* L.) UNFERTILIZED OVULES DIFFERENTIATION

The aim of research is to study the influence of the stage of development (size), the time of treatment of the buds with low positive temperatures and the genotype of the donor sample on the dedifferentiation of callus from unpollinated ovules of spring rape. Research objectives: to introduce isolated ovules into in vitro crop and determine the frequency of explants dedifferentiation on Murashige-Skoog (MS) agar nutrient medium with the addition of growth regulators 2,4-D (2-4 dichlorophenoxyacetic acid) and kinetin at 5.0 mg / l. The objects of the study were non-pollinated ovules of eight hybrid samples of spring rape. Samples 1 and 2 formed callus tissue with a frequency of 2.6 and 2.5 %, respectively. Ovules isolated from buds of the studied sizes (2.0; 4.0; 6.0 mm) differed in the frequency of callus dedifferentiation from 11.59 to 16.95 %. The ovules isolated from the 6.0 mm buds were the most competent for callus formation and formed callus with a maximum frequency of 16.95 %. Treatment of inflorescences for 24, 36 and 60 hours at low temperatures of 4 ± 1 ° C does not have a positive effect on the formation of callus tissue from ovules. The frequency of dedifferentiation decreases from 7.29 % without treatment of buds to 1.24 % - with 60 hours of treatment. The results of the cultivation of ovules on the initial nutrient medium showed that the frequency of dedifferentiation in the studied genotypes of spring rape varied from 0.2 (sample 188) to 2.6 % (sample 1). Ovules isolated from donor plants obtained using tissue culture induced callus tissue at a frequency of 15.57 %. Secondary structures and seedlings were obtained on MS medium supplemented with 6-BAP (6-benzylaminopurine) - 0.5 mg / L and kinetin - 3.0 mg / L. The results obtained indicate the effect of preprocessing, the size of the buds and the genotype of the donor plant on the frequency of dedifferentiation of ovules of spring rape.

***Keywords**: nutrient medium, genotype, non-pollinated ovules, ovules, callus formation.*

Введение. Рапс яровой (*Brassica napus* L.) – ценная масличная и кормовая культура, хорошо приспособленная для возделывания в умеренном климате. С точки зрения физиологии питания человека рапсовое масло имеет преимущество перед другими растительными маслами, так как содержит все физиологически важные кислоты в оптимальном соотношении [1].

Одним из важных элементов повышения продуктивности рапса является возделывание гетерозисных гибридов на стерильной основе. В гетерозисной селекции основным требованием, предъявляемым к родительским формам, является их гомозиготность по большинству генов. Одним из путей получения гомозиготных линий ярового рапса является гаплоидия. При использовании гаплоидии процесс формирования гомозиготных линий по сравнению с традиционными методами селекции сокращается на 5–7 лет [2].

У растений с мужской стерильностью гиногенез является единственным способом получения гаплоидов, так как признак ЦМС передается только с материнской цитоплазмой. Разработка нового регламента получения исходных форм в достаточном количестве и внедрение этих разработок в селекционный процесс будет способствовать получению конкурентоспособных гибридов с комплексом желаемых хозяйственно полезных признаков [3].

Цель исследования: изучение влияния стадии развития семязачатков (размера бутонов), времени обработки бутонов пониженными положительными температурами и генотипа донорного образца на дедифференциацию каллуса из неопыленных семязачатков ярового рапса.

Задачи исследования: ввести в культуру *in vitro* изолированные семязачатки и определить частоту дедифференциации эксплантов на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением регуляторов роста 2,4-Д

(2-4 дихлорфеноксиуксусная кислота) и кинетина по 5,0 мг/л.

Объекты и методы исследования. В качестве донорного материала использовались гибриды F_1 и образцы, полученные через культуру тканей *in vitro*. Бутоны собирали с центральной кисти, так как по сравнению с побегами первого и второго порядков они обладают лучшей способностью к каллусообразованию и регенерации растений [4]. Длина бутонов, взятых для исследования, составляла 2,0; 4,0; 6,0 мм.

Для повышения индуцирующей способности неоплодотворенных семязачатков проводили предобработку бутонов низкими положительными температурами. Собранные бутоны помещали в холодильник на 24; 36 и 60 ч при температуре 4±1 ºС. В качестве стерилизующего агента использовался 7 % раствор Domestos, экспозиция бутонов в растворе составляла 10 мин. Затем бутоны 3–4 раза промывались стерильной дистиллированной водой. Изолирование семязачатков проводили в стерильных условиях ламинар-бокса под бинокулярной лупой (МБС-10). После извлечения из завязей семяпочки помещались на поверхность питательной среды по 16–22 шт. Культивирование неоплодотворенных семяпочек проводилось на поверхности питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением 2,4-Д (2-4 дихлорфеноксиуксусная кислота) и кинетина по 5,0 мг/л [5]. Культивирование эксплантов проводили при 16-часовом фотопериоде и температуре 25±2 ºС. Наблюдение за культурой и анализ динамики развития проводили каждые 10 дней.

Результаты исследования. При введении в культуру *in vitro* семяпочки отличались размерами, плотностью оболочек и цветом. Семязачатки, изолированные из бутонов, длиной от 2,0 до 3,0 мм, отличались малыми размерами, имели светлый цвет и почти прозрачные покровы. Семязачатки, изолированные из более крупных бутонов, обладали не только большим размером, но и более плотными оболочками и имели светло-зеленый цвет.

Через неделю культивирования неоплодотворенные семяпочки увеличились в размерах и благодаря накоплению хлорофилла приобрели темно-зеленый цвет. В этот же период наблюдали начало образования соматического каллуса из клеток фуникулуса, которые не были удалены при изолировании семязачатков (рис. 1). Образовавшийся шероховатый, зеленый, плотный каллус удаляли при пересадке на органогенную среду.

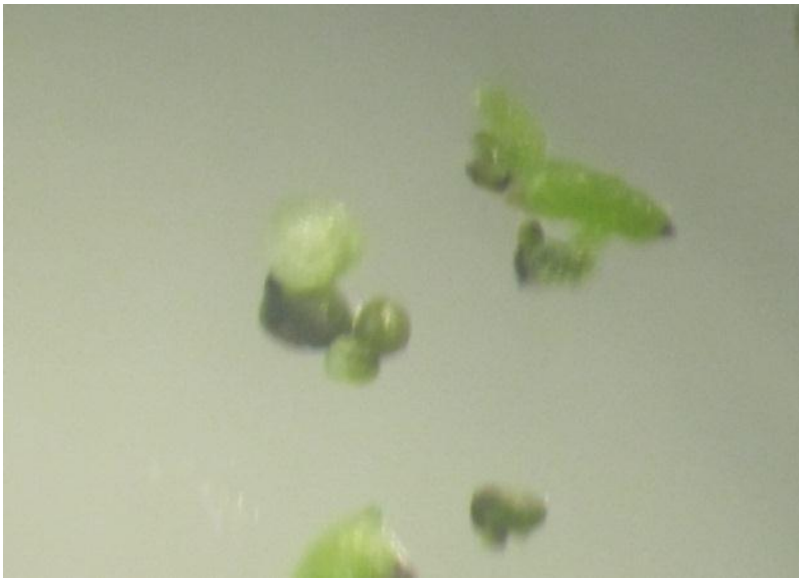


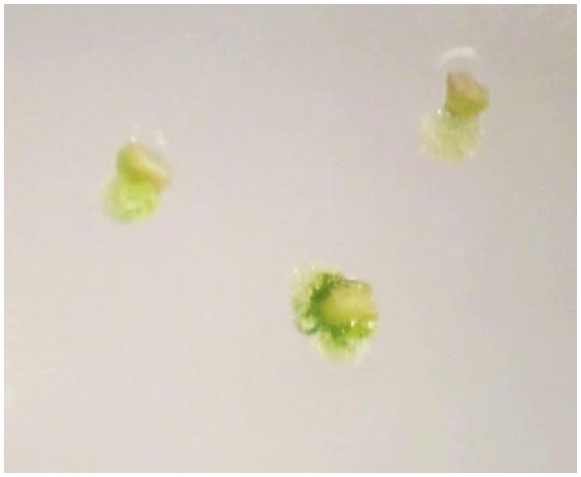
Рис. 1. Развитие неоплодотворенных семязачатков на инициальной питательной среде через 30 сут

Процессы формирования морфогенной каллусной ткани из семязачатков протекали медленно. Большая их часть останавливалась в развитии и погибала. Отзывчивые семяпочки на первичной среде формировали морфогенный каллус, а при пересадке на органогенную среду

наблюдали формирование как морфогенного каллуса, так и зеленых вторичных новообразований (рис. 2).

Семяпочки, извлеченные из бутонов исследуемых размеров (2,0; 4,0; 6,0 мм), проявляли разную способность к каллусообразованию. Интервал отзывчивости составил от 11,59 до 16,95 % (табл. 1). Наиболее компетентными к регенерации оказались семязачатки, извлеченные из бутонов размером 6,0 мм (т. е. содержащие зрелый или почти зрелый зародышевый мешок).

a



b

Рис. 2. Дедифференциация семязачатков:
a – морфогенный каллус; b – вторичные структуры

Таблица 1

Влияние размера бутонов на инициацию гиногенеза ярового рапса *in vitro*

Размер бутонов, мм	Количество культивируемых семяпочек, шт.	Частота каллусообразования, %
2,0	69	11,59
4,0	194	12,89
6,0	596	16,95
$НСР_{0,05}$		0,05

Полученные данные согласуются с целым рядом отечественных научных работ, где показано, что разные виды покрытосеменных растений имеют различные оптимальные стадии развития зародышевого мешка для инициации гиногенеза и переключения программы развития с гаметофитного на спорофитный путь. Например, исследования, проводившиеся на огурце (*Cucumis sativus* L.) [6] и сахарной свекле (*Beta vulgaris* L.), также показали, что изолированные неоплодотворенные семяпочки в условиях *in vitro* способны к новообразованиям на всех этапах развития [7]. Но наиболее предпочтительными являются семязачатки, имеющие зрелый или почти зрелый зародышевый мешок.

Эффект от обработки бутонов пониженными положительными температурами (4±1 ºС) имел обратную зависимость от длительности воздействия. Наибольшую отзывчивость проявляли семязачатки, которые не подвергались воздействию пониженных температур (табл. 2). Обработка соцветий свыше 24 ч приводила к снижению степени дедифференциации семяпочек *in vitro*.

Зависимость регенерационной способности семязачатков от температурного воздействия была отмечена и на других культурах. Так, в исследованиях, проводившихся на сахарной свекле, авторы отмечали некоторое увеличение регенерационной способности при предварительной обработке пониженной температурой [8].

Таблица 2

Влияние предобработок бутонов пониженными положительными температурами на дедифференциацию неоплодотворенных семяпочек ярового рапса

Время предобработки, ч	Количество культивируемых семяпочек, шт.	Частота каллусообразования, %
Без обработки	2319	7,29
24	2955	6,67
36	1871	1,76
60	1208	1,24
$НСР_{0,05}$		0,14

В таблице 3 представлены результаты культивирования семязачатков гибридных образцов ярового рапса, используемых в исследовании. Изучаемые генотипы обладают различной способностью к дедифференциации семяпочек в культуре *in vitro*. Частота дедифференциации у исследуемых образцов составила от 0,2 (обр. 188) до 2,6 % (обр. 1). Наибольшей отзывчивостью отличаются образцы 1 и 2, у которых наблюдалась дедифференциация семяпочек 2,6 и 2,5 % соответственно. Различия между этими образцами несущественны.

Таблица 3

Отзывчивость гибридных образцов в культуре *in vitro*

Номер образца	Количество культивируемых семяпочек, шт.	Частота каллусообразования, %
1	1138	2,6
2	827	2,5
185	639	0,5
186	1117	0,9
187	1741	1,0
188	927	0,2
189	788	1,0
190	1559	1,5
Всего	8536	1,37
$НСР_{0,05}$		0,45

Известно, что образцы, полученные с использованием культуры тканей *in vitro*, способны изменять статус генотипа донорного растения. Возникают генетические вариации – важная составляющая любой селекционной программы [9]. В таблице 4 показаны результаты культивирования неопыленных семяпочек из донорных растений, полученных через гиногенез (ГГ), андроклинию (АЛ) и каллусогенез (R – из каллуса листового эксплантата). Средняя частота каллусообразования у образцов, прошедших через культуру тканей, существенно выше (15,57 %), чем у исходных образцов (1,37 %). Особенно это видно при дедифференциации каллуса у донорного образца № 190 – 1,5 % и биотехнологических линий ГГ 190 – 29,7 % и АЛ 190 – 10,2 % (табл. 3, 4).

Таблица 4

Отзывчивость образцов, полученных через культуру тканей *in vitro*

Номер образца	Количество культивируемых семяпочек, шт.	Частота каллусо-образования, %
ГГ 404	53	7,54
ГГ 440	154	6,49
R 404	204	8,33
ГГ 190	306	29,7
АЛ 190	195	10,2
	912	15,57
$НСР_{0,05}$		2,92

Морфогенные каллусы, полученные на инициальной среде, а также вторичные структуры культивировали на среде MS с добавлением 6-БАП – 0,5 мг/л и кинетина – 3,0 мг/л, формировали меристематические зоны и проростки.

Выводы. В ходе настоящего исследования было установлено, что лучшая частота дедифференциации семязачатков ярового рапса получена при изолировании их из бутонов размером 6 мм. Предобработка пониженными положительными температурами (4±1 ºС) ингибирует развитие образования каллуса с 7,29 до 1,24 %. Также на дедифференциацию семязачатков влияет генотип донорного образца и способ их получения.

Литература

1. *Ackman R.G.* Canola fatty acids: an ideal mixture for health, nutrition and food use // F. Shahidi (ed.), Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Van Nostrand Reinhold, New York. 1990. P. 81–98.
2. *Ellialtioglu S., Sari N., Abak K.* Production of haploid plants // In: Babaoglu M., Gazel E., Ozcan S. (eds) Plant biotechnology I, Selcuk Univ. Press. 2001. P. 137–189.
3. *Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Черкасова Н.Н.* и др. Перспективные технологии изолированных тканей в селекционном процессе сахарной свеклы // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. № 6. С. 13–18.
4. *Котлярова Е.Б.* Аспекты применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.): автореф. дис. … канд. биол. наук: 06.01.05. Рамонь, 2007. 24 с.
5. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol plant. 1962. V. 15. P. 215–222.
6. *Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П.* Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L. // Гавриш. 2009. № 4. С. 40–44.
7. *Жужжалова Т.П. , Подвигина О.А., Знаменская В.В.* и др. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*): факторы и диагностические признаки // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т 51, № 5. С. 636–644.
8. *Васильченко Е.Н., Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П.* Возможность создания гомозиготного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Наука и образование: отечественный и зарубежный опыт: сб. тр. Семнадцатой междунар. науч.-практ. конф. Белгород, 2019. С. 259–262.
9. *Mohan J.* Tissue culture-derived variation in crop improvement // Euphytica. 2001. 118. P. 153–166.

References

1. *Ackman R.G.* Canola fatty acids: an ideal mixture for health, nutrition and food use // F.

Shahidi (ed.), Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Van Nostrand Reinhold, New York. 1990. R. 81–98.

2. *Ellialtioglu S., Sari N., Abak K.* Production of haploid plants // In: Ba-baoglu M., Gazel E., Ozcan S. (eds) Plant biotechnology I, Selcuk Univ. Press. 2001. P. 137–189.
3. *Zhuzhzhalova T.P., Kolesnikova E.O., Cherkasova N.N.* i dr. Perspektivnye tekhnologii izolirovannykh tkanei v selektsionnom protsesse sakharnoi svekly // Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka. 2018. № 6. S. 13–18.
4. *Kotlyarova E.B.* Aspekty primeneniya metodov biotekhnologii v se-lektsii yarovogo rapsa (Brassica napus L.): avtoref. dis. … kand. biol. nauk: 06.01.05. Ramon', 2007. 24 s.
5. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol plant. 1962. V. 15. P. 215–222.
6. *Shmykova N.A., Suprunova T.P.* Induktsiya ginogeneza v kul'ture in vitro neopylennykh semyapochek *Cucumis sativus L.* // Gavrish. 2009. № 4. S. 40–44.
7. *Zhuzhzhalova T.P., Podvigina O.A., Znamenskaya V.V.* i dr. Gaploidnyi partenogenez in vitro u sakharnoi svekly (Beta vulgaris): faktory i diagnosticheskie priznaki // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. 2016. T 51, № 5. S. 636–644.
8. *Vasil'chenko E.N., Kolesnikova E.O., Zhuzhzhalova T.P.* Vozmozhnost' sozdaniya gomozigotnogo materiala sakharnoi svekly v kul'ture in vitro // Nauka i obrazovanie: otechestvennyi i zarubezhnyi opyt: sb. tr. Semnadtsatoi mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Belgorod, 2019. S. 259–262.
9. *Mohan J.* Tissue culture-derived variation in crop improvement // Euphytica. 2001. 118. P. 153–166.