

Анатолий Анатольевич Муравлев<sup>1✉</sup>, Екатерина Викторовна Чеснокова<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Липецкий научно-исследовательский институт рапса – филиал Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта, Липецк, Россия

<sup>1</sup>anatoly.muravleff@yandex.ru

<sup>2</sup>catc4es@yandex.ru

## АНДРОГЕНЕЗ СОРТОВ ЯРОВОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS L.*) И ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАНТОВ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ ПЫЛЬЦЫ

Цель исследований – изучить способность генотипов ярового рапса отечественной и зарубежной селекции к индукции эмбриоидов в культуре пыльников *in vitro*, а также регенерационный потенциал сформировавшихся эмбриоидов и фертильность полученных из них андроклиновых растений. Задачи: ввести в культуру *in vitro* изолированные пыльники, определить частоту индукции эмбриодогенеза изучаемых генотипов и их регенерационную способность. Пыльники культивировали на питательной среде В5 с добавлением 2,4-Д в концентрации 0,1 мг/л и НУК – 0,1 мг/л. Содержание хелата железа в среде было увеличено до 12,5 мг/л. Индукцию эмбриоидов получили у всех изучаемых генотипов. По способности к эмбриодогенезу изучаемые образцы отличались существенно. Максимальное количество эмбриоидов (9,26 %) было получено у сорта Торас. Семь сортов – Авангард, Булат, Визит, Лира, Липецкий, Ратник, Рубеж индуцировали эмбриоиды с частотой меньше 1,0 %. По мере развития и накопления хлорофилла эмбриоиды пересаживали на питательную среду, не содержащую регуляторов роста, где они инкубировались до развития побегов и корней. Проростки с хорошо развитой корневой системой и 3 настоящими листочками пересаживали в почву. В период цветения растений соцветия закрывали изоляторами с целью самоопыления и исключения попадания чужой пыльцы. Многие андроклиновые растения, полученные из первичных эмбриоидов, имели редуцированные (недоразвитые) пыльники. Основную массу таких растений представляли гаплоиды. Часть растений имела морщинистые или утолщенные части пыльника. Цитологический анализ показал, что пыльники с различными отклонениями продуцируют мало пыльцы, большая часть которой является стерильной. Разнокачественность пыльцы является одним из главных факторов низкой завязываемости семян под изолятором. Андроклиновые растения с наличием стерильной пыльцы перспективны для использования в гибридизации после их генетического анализа.

**Ключевые слова:** яровой рапс, растения, пыльники, эмбриоиды, регенерация

**Для цитирования:** Муравлев А.А., Чеснокова Е.В. Андрогенез сортов ярового рапса (*Brassica napus L.*) и оценка регенерантов на фертильность пыльцы // Вестник КрасГАУ. 2022. № 3. С. 17–22. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-17-22.

Anatoly Anatolievich Muravlev<sup>1✉</sup>, Ekaterina Viktorovna Chesnokova<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Lipetsk Research Institute of Rape Seeds – branch of the All-Russian Research Institute of Oilseeds named after V.S. Pustovoit, Lipetsk, Russia

<sup>1</sup>anatoly.muravleff@yandex.ru

<sup>2</sup>catc4es@yandex.ru

## SPRING RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) VARIETIES ANDROGENESIS AND REGENERATORS EVALUATION FOR POLLEN FERTILITY

The purpose of research is to study the ability of spring rapeseed genotypes of domestic and foreign selection to induce embryoids in anther culture *in vitro*, as well as the regeneration potential of formed embryoids and the fertility of androclinic plants obtained from them. Objectives: to introduce isolated anthers into *in vitro* culture, to determine the frequency of induction of embryoidogenesis of the studied genotypes and their regenerative capacity. Anthers were cultivated on B5 nutrient medium supplemented with 2,4-D at a concentration of 0.1 mg/l and NAA at a concentration of 0.1 mg/l. The content of iron chelate in the medium was increased to 12.5 mg/L. Embryoid induction was obtained in all studied genotypes. According to the ability to embryoidogenesis, the studied samples differed significantly. The maximum number of embryoids (9.26 %) was obtained from the Topas variety. Seven varieties – Avangard, Bulat, Visit, Lira, Lipetsky, Ratnik, Rubezh induced embryoids with a frequency of less than 1.0 %. With the development and accumulation of chlorophyll, the embryoids were transplanted onto a nutrient medium that did not contain growth regulators, where they were incubated until the development of shoots and roots. Seedlings with a well-developed root system and 3 true leaves were transplanted into the soil. During the flowering period of plants, the inflorescences were covered with insulators for the purpose of self-pollination and to exclude the ingress of foreign pollen. Many androclinic plants obtained from primary embryoids had reduced (underdeveloped) anthers. The bulk of these plants were haploids. Some plants had wrinkled or thickened parts of the anther. Cytological analysis showed that anthers with various deviations produce little pollen, most of which is sterile. Pollen diversity is one of the main factors of low seed set under the isolator. Androclinic plants with the presence of sterile pollen are promising for use in hybridization after their genetic analysis.

**Keywords:** spring rapeseed, plants, anthers, embryoids, regeneration

**For citation:** Muravlev A.A., Chesnokova E.V. Spring rape (*Brassica napus* L.) varieties androgenesis and regenerators evaluation for pollen fertility // Bulliten KrasSAU. 2022;(3): 17–22. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-17-22.

**Введение.** В современной селекции особое внимание уделяется созданию генетического разнообразия сельскохозяйственных культур. Для этого используют отдаленную гибридизацию, мутагенез и трансформацию растений. В дополнение к этим методам в последние годы широко изучается изменчивость растений и клеток в условиях *in vitro*.

На сегодняшний день гаплоидные технологии являются неотъемлемой частью селекционных программ по созданию высокопродуктивных гибридов и сортов многих сельскохозяйственных культур, так как позволяют существенно сократить сроки получения исходного гомозиготного материала [1]. Гаплоиды ярового рапса получают с использованием культуры пыльников и микроспор на искусственных питательных средах.

Удвоенные гаплоиды, полученные на основе гибридов F1, обеспечивают возможность ускоренного получения гомозигот и сокращения объемов селекционной работы. Получение растений из микроспор в культуре пыльников является распространенным методом создания гомозиготных линий у многих видов *Brassica* [2, 3].

На получение андроклинических линий оказывают влияние условия выращивания донорных растений, предварительная обработка бутонов пониженной положительной температурой, состав питательной среды и условия культивирования пыльников [4–7]. Правильный подбор условий культивирования позволяет максимально реализовать андрогенетический потенциал растения. Но лимитирующим фактором остается влияние генотипа донорного растения, которое проявляется в частоте эмбриоидогенеза, качестве эмбриоидов и их регенерационной способности.

**Цель исследований:** изучить способность генотипов ярового рапса отечественной и зарубежной селекции к индукции эмбриоидов в культуре пыльников *in vitro*, а также регенерационный потенциал сформировавшихся эмбриоидов и фертильность полученных из них андроклинических растений.

**Задачи:** ввести в культуру *in vitro* изолированные пыльники, определить частоту индукции эмбриоидогенеза изучаемых генотипов и их регенерационную способность.

**Материалы и методы.** В качестве донорного материала использовались сорта ярового рапса отечественной (Авангард, Аккорд, Булат, Визит, Лира, Липецкий, Ратник, Рубеж) и зарубежной (Торас и гибрид Salsa) селекции. Предварительная оценка андрогенетического потенциала образцов с ценными признаками необходима для массового получения дигаплоидов, которые могут быть включены в селекционные программы. Также это является обязательным этапом при выполнении некоторых биотехнологических программ, например таких, как физический и химический мутагенез *in vitro* [8].

Сбор соцветий, определение стадии развития микроспор в пыльниках проводили согласно общепринятой методике, использующейся в лаборатории биотехнологии ЛНИИР [9]. Срезанные соцветия помещали в стакан с водным раствором гиббериллиновой кислоты в концентрации 0,1 мг/л на 48 ч в холодильник при температуре 4 °С. Далее соцветия стерилизовали в 7 % водном растворе «Domestos» в течение 10 мин последующим 3-кратным промыванием стерильной дистиллированной водой. Изолирование пыльников проводили в асептических условиях. Пыльники культивировали в темноте на питательной среде В5 с добавлением 2,4-Д и НУК в концентрациях 0,1 мг/л. На первом этапе инкубировали в течение 48 ч при температуре 35 °С в условиях термостата, на втором этапе – при 26 °С до формирования эмбрионов. Сформировавшиеся эмбрионы выдерживали при непрерывном освещении до появления хлорофилла. Зеленые эмбрионы пересаживали на регенерационную питательную среду с концентрацией сахарозы, уменьшенной до 1 %, и без добавления регуляторов роста. Образовавшиеся проростки с хорошо развитой корневой системой и 3 настоящими листочками пересаживали в смесь почвы и песка в соотношении 3 : 1 и накрывали пластиковыми стаканами для акклиматизации в условиях теплицы.

В фазу цветения фертильные растения закрывали изоляторами, а стерильные (гаплоидные) подвергали воздействию колхицина с целью удвоения числа хромосом. Оценку жизнеспособности пыльцы проводили с помощью флуоресцеиндиацетата (FDA) [10].

**Результаты и их обсуждение.** Отзывчивые пыльники всех изучаемых сортов при культивировании на инициальной питательной среде формировали эмбрионы следующих типов: семядольные (котиледольные), торпедовидные, сердцевидные, глобулярные и полиэмбрионы. По способности к эмбриогенезу донорные сорта отличались между собой (табл.). Минимальная частота эмбриогенеза наблюдалась у сорта Ратник – 0,07 %, а максимальная индукция эмбрионов составила 9,26 % – у сорта Торас. Различия с другими изучаемыми сортами достоверны.

Изучаемые генотипы отличались также и по способности к регенерации растений из первичных эмбрионов (табл.). У сортов Авангард и Рубеж растения получить не удалось. Максимальное количество растений формировали эмбрионы сортов Аккорд (20 растений) и Ермак (22 растения). В то же время эмбрионы сортов Лира и Ратник имели 100 % регенерацию растений. Значительная часть (56,6 %) первичных эмбрионов хорошо прорастала в нормальные растения на регенерационной питательной среде без содержания регуляторов роста.

У сорта Торас только сердцевидные и торпедовидные эмбрионы прорастали на среде без содержания гормонов. Котиледольные эмбрионы имели сросшиеся семядольные листочки, которые способствовали сдерживанию развития настоящих листьев. Стебель у таких эмбрионов утолщался и на поверхности проростков формировались вторичные эмбрионы. Регенерационная способность растений сорта Торас составила 23,5 %.

#### Андрогенез пыльников *in vitro* сортов ярового рапса

Сорт	Количество, шт.		Частота эмбриогенеза, %	Получено растений, шт. (%)
	культивируемых пыльников	эмбрионов		
1	2	3	4	5
Авангард	1248	1	0,08	0
Аккорд	1933	21	1,09	20 (95,3)
Булат	1585	3	0,19	2 (66,7)
Визит	3785	31	0,82	5 (16,1)
Ермак	2448	26	1,06	22 (84,6)

Окончание табл.

1	2	3	4	5
Лира	2315	11	0,48	11 (100)
Липецкий	2171	10	0,46	9 (90,0)
Ратник	1514	1	0,07	1 (100)
Рубеж	832	1	0,12	0
Торас	367	34	9,26	8 (23,5)
Salsa	214	4	1,87	2 (50,0)
Всего	18422	143	0,77	81 (56,6)
НСР <sub>0,05</sub>	–	–	0,52	–

Наблюдения за развитием андроклиновых растений, полученных из первичных эмбрионидов, показали, что многие из них имели в цветках редуцированные пыльники. Основная масса таких растений представляла собой гаплоиды. На рисунке 1, а, показано растение с рыхлым цветком, лепестки широко раскрыты, маленькие редуцированные пыльники хорошо видны (классический вид гаплоидного цветка рапса). Помимо класси-

ческих гаплоидных были выявлены растения с морфологическими изменениями в строении цветка. На рисунке 1, б, представлено соцветие андроклинового растения гибрида Salsa, у которого отсутствовали пыльники и тычиночные нити. Можно предположить, что данные растения являются стерильным компонентом, использованным при создании гибрида.



Рис. 1. Соцветия цветущих андроклиновых растений ярового рапса:  
а – соцветие гаплоидного растения сорта Аккорд;  
б – соцветие стерильного растения гибрида Salsa

Также были обнаружены растения с отклонениями в развитии пыльников (недоразвитые и утолщенные части пыльника). Цитологический анализ показал, что такие недоразвитые пыльники продуцируют очень малое количество пыль-

цы, большая часть которой является стерильной (рис. 2). Стерильная пыльца на препарате не окрашивалась, а фертильная приобретала окраску от сиреневого до светло-бордового цвета.

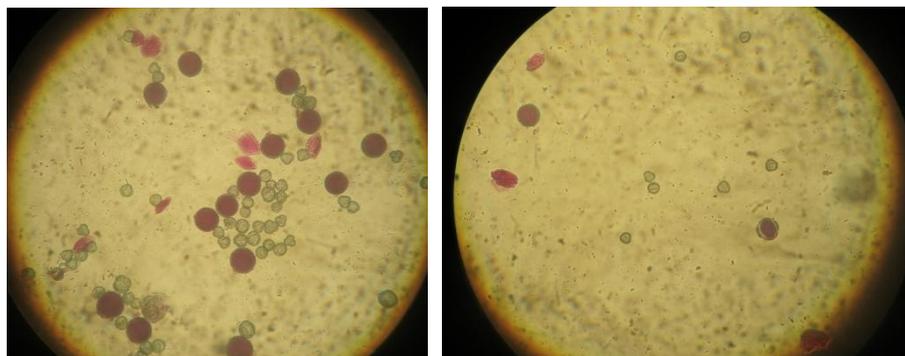


Рис. 2. Пыльца в недоразвитых пыльниках ( $\times 250$ )

Все полученные андроклинные растения во время цветения были закрыты изоляторами. Часть изолированных соцветий характеризовалась нормальным развитием цветков и пыльников, но при этом показала очень низкую завязываемость семян (1–3 шт.) (рис. 3, а). Анализ

пыльцы этих растений выявил наличие большого числа стерильных пыльцевых зерен (рис. 3, б), что и стало причиной низкой завязываемости семян при проведении самоопыления.

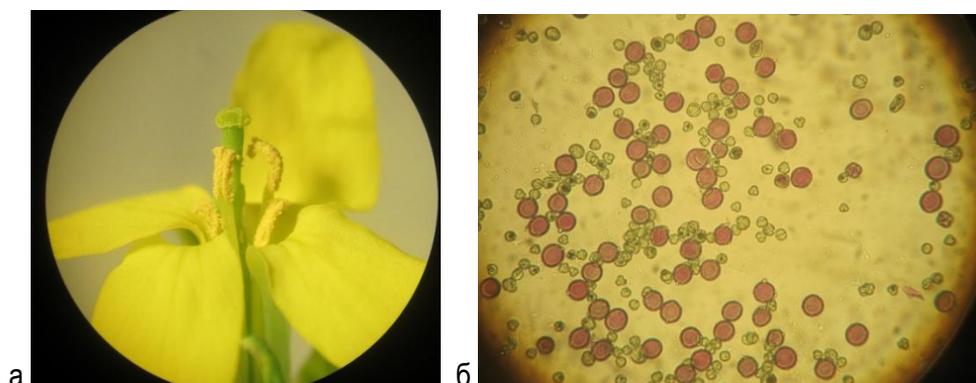


Рис. 3. Пыльники и пыльцевые зерна андроклинного растения сорта Ратник: а – цветок с нормальными пыльниками; б – смесь стерильной и фертильной пыльцы ( $\times 250$ )

Можно предположить, что в процессе культивирования на искусственной питательной среде у некоторых эмбриондов произошли генетические изменения, что привело к нарушениям развития во время микроспорогенеза.

В дальнейших исследованиях планируется выявлять андроклинные растения с наличием стерильной пыльцы для использования их в гибридизации.

**Заключение.** Проведенное исследование позволило выделить генотипы, отзывчивые к эмбриондогенезу в культуре пыльников *in vitro*. Наибольшее количество эмбриондов (9,26 %) было получено у сорта Торас. Также были выделены 4 донорных образца, обладающие высокой регенерационной способностью первичных эмбриондов. Это сорта Аккорд (95,3 %), Ермак (84,6), Лира (100) и Ратник (100 %). Максимальное количество андроклильных растений получили у сортов Аккорд (20 шт.) и Ермак (22 шт.). Перечисленные выше сорта являются перспективными донорами для получения дигамплоидов в культуре пыльников *in vitro* и дальнейшего их использования в селекционных программах.

Часть андроклильных растений имела нарушения в развитии пыльников, продуцировавших очень малое количество пыльцы, большая часть которой была стерильной. Также были получены регенеранты с нормальным развитием пыльников, содержащие разнокачественную пыльцу (стерильную и фертильную). Анд-

роклинные растения с наличием стерильной пыльцы перспективны для использования их в гибридизации.

#### Список источников

1. Уразалиев К.Р. Гаплоидные технологии в селекции растений // Биотехнология. Теория и практика. 2015. № 3. С. 33–43.
2. Метод культуры пыльников *in vitro* для создания удвоенных гаплоидов капусты белокочанной / Е.Г. Савенко [и др.] // Овощеводство. 2017. № 1 (34). С. 44–47.
3. Создание нового исходного материала озимого рапса с использованием межвидовой гибридизации, мутагенеза и культуры *in vitro* / Я.Э. Пулюк [и др.] // Земледелие и селекция в Беларуси. 2021. № 57. С. 378–386.
4. Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов / В.Ф. Пивоваров [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 1. С. 143–151.
5. Козарь Е.В., Домблудес Е.А., Солдатенко А.В. Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. № 1 (24). С. 31–39.
6. Влияние инициальных сред и длительности холодной предобработки на эффективность андрогенеза в культуре изолирован-

- ных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская / И.В. Любушкина [и др.] // Известия ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2020. Т. 34. С. 20–32.
7. Разумкова Г.М. Получение гаплоидов в культуре пыльников (или микроспор) // Развитие земледелия в Нечерноземье: проблемы и их решение: сб. тр. по итогам междунар. науч.-практ. конф. СПб.; Пушкин, 2016. С. 98–103.
  8. Мутагенез в культуре изолированных микроспор рапса / К.Ж. Жамбакин [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. 2015. № 3. С. 20–32.
  9. Муравлев А.А., Артамонов А.А. Технология получения удвоенных гаплоидов ярового рапса: технолог. рекомендации. М., 2009. 24 с.
  10. Монахос С.Г. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор и селекция F<sub>1</sub>-гибридов на основе современных методов биотехнологии: метод. рекомендации. М.: Изд-во РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2014. 42 с.
- mutageneza i kul'tury *in vitro* / Ya. E. Pilyuk [I dr.] // Zemledelie i selekciya v Belarusi. 2021. № 57. S. 378–386.
  4. Sozdanie gibridov kapusty belokochannoj (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) novogo pokoleniya s ispol'zovaniem linij udvoennyh gaploidov / V.F. Pivovarov [I dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2017. T. 52, № 1. S. 143–151.
  5. Kozar' E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Faktory, vliyayushchie na poluchenie DH-rastenij v kul'ture mikrospor *in vitro* redisa evropejskogo // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2020. № 1 (24). S. 31–39.
  6. Vliyanie inicial'nyh sred i dlitel'nosti holodovoj predobrabotki na `effektivnost' androgeneza v kul'ture izolirovannyh pyl'nikov ozimoy pshenicy sorta Irkutskaya / I.V. Lyubushkina [i dr.] // Izvestiya IGU. Ser. Biologiya. `Ekologiya. 2020. T. 34. S. 20–32.
  7. Razumkova G.M. Poluchenie gaploidov v kul'ture pyl'nikov (ili mikrospor) // Razvitie zemledeliya v Nechernozem'e: problemy i ih reshenie: sb. tr. po itogam mezhdunar. nauch.-prakt. konf. SPb.; Pushkin, 2016. S. 98–103.
  8. Mutagenez v kul'ture izolirovannyh mikrospor rapsa / K.Zh. Zhambakin [i dr.] // Biotekhnologiya. Teoriya i praktika. 2015. № 3. S. 20–32.
  9. Muravlev A.A., Artamonov A.A. Tehnologiya polucheniya udvoennyh gaploidov yarovogo rapsa: tehnolog. rekomendacii. M., 2009. 24 s.
  10. Monahos S.G. Sozdanie chistyh linij – udvoennyh gaploidov kapusty v kul'ture izolirovannyh mikrospor i selekciya F<sub>1</sub>-gibridov na osnove sovremennyh metodov biotekhnologii: metod. rekomendacii. M.: Izd-vo RGAU – MSHA im. K.A. Timiryazeva, 2014. 42 s.

### References

1. Urazaliev K.R. Gaploidnye tehnologii v selekcii rastenij // Biotekhnologiya. Teoriya i praktika. 2015. № 3. S. 33–43.
2. Metod kul'tury pyl'nikov *in vitro* dlya sozdaniya udvoennyh gaploidov kapusty belokochannoj / E.G. Savenko [i dr.] // Ovoshevodstvo. 2017. № 1 (34). S. 44–47.
3. Sozdanie novogo ishodnogo materiala ozimogo rapsa s ispol'zovaniem mezhvidovoj gibridizacii,

Статья принята к публикации 16.12.2021 / The article accepted for publication 16.12.2021.

Информация об авторах:

**Анатолий Анатольевич Муравлев**, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса, кандидат биологических наук

**Екатерина Викторовна Чеснокова**, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса

Information about the authors:

**Anatoly Anatolievich Muravlev**, Leading Researcher, Laboratory of Rapeseed Biotechnology, Candidate of Biological Sciences

**Ekaterina Viktorovna Chesnokova**, Junior Researcher, Laboratory of Rapeseed Biotechnology