

На правах рукописи

СИНИЦЫНА АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ
УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ
МИКРОСПОР РАСТЕНИЙ РОДА *BRASSICA* L.**

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Монахос Сократ Григорьевич**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Домблидес Артур Сергеевич**, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией генетики и цитологии ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»

Мухина Жанна Михайловна, доктор биологических наук, советник директора ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» по инновациям и координации НИР

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Защита состоится 28 июня 2023 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 35.2.030.08 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел/факс: 8 (499) 976-21-84.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «__»_____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Вертикова Елена Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время возросли требования к используемым в производстве сортам и гибридам. На первый план вышли F1-гибриды, обладающие комплексной устойчивостью к болезням и вредителям и высокой выравненностью по основным хозяйственно ценным признакам. Одной из самых востребованных технологий для ускорения процесса получения F1-гибридов является производство линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) в культуре изолированных микроспор (КИМ) (Domblides et al., 2018; Djatchouk et al., 2019; Dong et al., 2021). КИМ ускоряет получение генетически стабильных линий, позволяет сочетать различные признаки в одном генотипе и облегчает поиск редких признаков, контролируемых рецессивными генами (Ferrie and Caswell, 2011).

Наибольший успех в получении удвоенных гаплоидов через культуру микроспор достигнут у рапса (*Brassica napus* L.). Эффективность УГ-технологии у других представителей рода *Brassica* остается по-прежнему низкой (Шмыкова и др., 2015; Dong et al., 2021). Исследователи отмечают, что генотипы вида *Brassica oleracea* L., как правило, менее отзывчивы к эмбриогенезу в культуре микроспор, чем генотипы *B. napus* L. и *B. rapa* L. (Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Gu et al., 2014; Шмыкова и др., 2015). Среди разновидностей вида *B. oleracea* частота эмбриогенеза в культуре микроспор наиболее высока у капусты брокколи (var. *italica* Plenck) (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001), капусты брюссельской (var. *gemmifera* (DC.) Zenker) (Ockendon and Sutherland, 1987) и капусты цветной (var. *botrytis* L.) (Gu et al., 2014), в то время как у капусты белокочанной (var. *capitata* L.) частота эмбриогенеза в целом ниже (Rudolf et al., 1999; Bhatia et al., 2017).

Высокая генотипспецифичность и низкая частота эмбриогенеза селекционно ценных генотипов является одной из главных проблем применяемых технологий производства ЛУГ растений рода *Brassica* (Olmedilla et al., 2010). Повышение частоты эмбриогенеза капустных культур возможно при подборе оптимальных условий культивации, например, состава среды (Bhatia et al., 2017).

У эмбриоидов большинства генотипов рода *Brassica*, полученных в культуре микроспор, наблюдается низкая способность к прорастанию, а также не прямое прорастание эмбриоидов с образованием адвентивных побегов или вторичный эмбриогенез (Dong et al., 2021). Кроме того, удвоение полученных гаплоидов спонтанно происходит лишь у части растений. Наибольшая частота спонтанного удвоения наблюдается у растений *B. rapa*, таких как репа (77-100%) (Takahashi et al., 2012), горчица полевая (20-66%) (Takahashi et al., 2012), капуста пекинская (60%) (Lee et al., 2014), и

разновидностей *B. oleracea*, например, брокколи (55-100%) (Yuan et al., 2015), кольраби (7-91%) (Dias et al., 2003).

Повышение частоты регенерации и формирование проростков из эмбриоидов без промежуточных стадий, а также повышение частоты спонтанной диплоидизации могло бы обеспечить производство большего числа удвоенных гаплоидов с минимальными усилиями и техническими ресурсами, что в свою очередь облегчило бы создание F1-гибридов капустных культур.

Степень разработанности темы. Первый протокол производства удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор был разработан для рапса (*B. napus* L.) (Lichter, 1981). Затем данный протокол, с небольшими модификациями, стали использовать для получения удвоенных гаплоидов у других растений рода *Brassica*: капусты цветной (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), капусты португальской (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala*), капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*) и капусты китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Duijs et al., 1992; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2008; Winarto and Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012).

Ряд исследователей сообщают об успешном усовершенствовании методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор брокколи (Dias et al., 2001; Na et al., 2011), капусты белокочанной (Yuan et al., 2012; Zeng et al., 2015), листовой капусты (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2011), рапса (Tian et al., 2004; Klutschewski, 2012). При этом многие генотипы растений рода *Brassica* по-прежнему могут быть неотзывчивы или низко отзывчивы, имеют низкие частоты образования проростков и спонтанной диплоидизации в КИМ и требуют поиска способов увеличения конечного выхода УГ капустных растений в КИМ.

Цель исследования – изучение влияния факторов на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор, частоту образования проростков из эмбриоидов, частоту прямого прорастания эмбриоидов растений рода *Brassica*: разновидностей *Brassica oleracea* L., таких как: капуста белокочанная (var. *capitata* L.), капуста кольраби (var. *gongylodes* L.), капуста брокколи (var. *italica* Plenck), капуста листовая (var. *acephala* DC.) и рапса (*Brassica napus* L.).

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить генотипспецифичность эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор гомозиготных (ЛУГ, инбредные линии)

и гетерозиготных (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.).

2. Изучить генотипспецифичность образования проростков из микроспорогенных эмбриодов *Brassica* и связь прямого прорастания эмбриодов с их морфологической зрелостью.

3. Изучить влияние антиоксидантов (аскорбат и глутатион) на жизнеспособность изолированных микроспор и частоту эмбриогенеза отзывчивых и неотзывчивых генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

4. Изучить влияние антибиотика (цефотаксим), полиамина (путресцин), дисахаридов (мальтоза, сахароза), спирта (маннитол) на этапе теплового шока (32,5⁰ C) изолированных микроспор *Brassica* на частоту микроспорогенного эмбриогенеза, образования проростков из эмбриодов и прямого прорастания эмбриодов.

5. Изучить влияние замены среды B5 на этапе изоляции и очистки микроспор и среды NLN-13 на этапе теплового шока 13%-м раствором сахарозы на частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков и частоту спонтанной диплоидизации капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

6. Изучить влияние воздействия низкой положительной температуры (5⁰ C) на микроспорогенные эмбриоды (*B. oleracea* L.) на частоту их прямого прорастания.

Научная новизна. Впервые показано, что изоляция, очистка микроспор и инкубирование во время прохождения теплового шока микроспор капусты белокочанной в 13% растворе сахарозы, рН 5,8 не оказывает негативного влияния на частоту эмбриогенеза микроспор и конечный выход УГ капусты белокочанной.

Впервые показано, что обработка эмбриодов капусты кольраби низкими положительными температурами (5⁰ C) в течение 3-9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков с 72,2% до 97,2%.

Впервые показано, что гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной имеют эквивалентные доли высоко и средне отзывчивых в культуре изолированных микроспор образцов – 27,3% и 24,5% соответственно.

Теоретическая и практическая значимость. В результате анализа генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор 56 гомозиготных (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготных генотипов (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B. oleracea*) отмечено, что соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым одинаково для гомозиготных 27,3/72,7% и гетерозиготных 24,5/75,5% образцов; соотношение отзывчивых генотипов (совокупность высоко, средне и низко отзывчивых) к неотзывчивым по каждой группе также имело сходство – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов.

Установлена высокая положительная связь ($r=0,87$) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. При этом в результате анализа генотипспецифичности прорастания эмбриоидов на твердой питательной среде показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* была в целом выше, чем в ранее проведенных исследованиях других авторов, и составила 57,9% у капусты белокочанной, 69,9% у рапса, 71,8% у кольраби, до 81,7% у брокколи.

Показано, что антиоксиданты (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) повышают (в 1,7 раза) частоту эмбриогенеза отзывчивых и способствуют эмбриогенезу неотзывчивых генотипов *B. oleracea*, что объясняется более высоким уровнем жизнеспособности изолированных микроспор, инкубируемых в жидкой питательной среде с антиоксидантами.

Установлено, что инкубирование изолированных микроспор в питательной среде с цефотаксимом (50 мг/л) на этапе теплового шока в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) стимулирует эмбриогенез неотзывчивого генотипа *B. oleracea* var. *capitata* L. и существенно (в 3-7 раз) повышает частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков до 91,7% и частоту прямого прорастания эмбриоидов до 60% *B. napus* L.

Показано, что инкубирование изолированных микроспор в среде NLN-13 с путресцином (0,2-0,5 мг/л) при температуре 32,5⁰ С в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без путресцина) не влияет на эмбриогенез микроспор и образование проростков из эмбриоидов рапса (*B.napus* L.), однако способствует получению эмбриоидов и растений-регенерантов неотзывчивого к эмбриогенезу генотипа капусты белокочанной (*B.oleracea* var. *capitata* L.).

При исследовании влияния инкубирования микроспор в растворах дисахаридов (мальтоза 130 г/л, сахароза 130 г/л), спирта (маннитол, 50 г/л) на этапе теплового шока (24 ч., 32,5⁰ С) показано, что растворы мальтозы или маннитола полностью ингибируют эмбриогенез микроспор *B. napus* L. и *B. oleracea* L., а раствор сахарозы увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход удвоенных гаплоидов (УГ) *B. napus* L. (не менее чем в 2 раза), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ *B. oleracea* L.

Отмечено, что использование раствора сахарозы (130 г/л) на этапе изоляции, очистки и инкубирования микроспор во время теплового шока (48 ч., 32,5⁰ С) с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 позволяет снизить трудоемкость и стоимость этих этапов, при этом значения частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации образцов *B. oleracea* L. сопоставимы со стандартным протоколом.

Показано, что воздействие низкой положительной температуры (5⁰ С) на эмбриониды кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в течение первых 3-9 дней после их пересадки на твердую питательную среду увеличивает частоту прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков из эмбрионидов до 94,4-97,2% по сравнению с культивированием эмбрионидов при 24⁰ С.

Методология и методы исследования. Теоретические исследования основаны на аналитическом обобщении опубликованных научных результатов. Экспериментальные исследования проведены с использованием стандартных и частных методик и последующей статистической обработкой данных. Полностью методология описана в главе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование 13% раствора сахарозы (рН 5,8) вместо среды В5 (130 г/л сахарозы, 50 г/л маннитола, рН 5,8) на этапе изоляции и очистки микроспор и вместо среды NLN-13 (рН 5,8) на этапе теплового шока не снижает частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор.

2. Обработка микроспорогенных эмбрионидов *Brassica oleracea* var. *gongylodes* L. низкой положительной температурой (5⁰ С) в течение 3-9 дней стимулирует их прямое прорастание.

3. Антиоксиданты поддерживают жизнеспособность микроспор *B. oleracea* L. на питательной среде и, как следствие, существенно повышают частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор.

Степень достоверности. Достоверность исследований подтверждается обширными экспериментальными исследованиями, выбором необходимого количества повторностей и объема выборки при закладке опытов, а также статистической обработкой полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на: Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию В.А. Михельсона (г. Москва, 2020); Всероссийской с международным участием научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (г. Москва, 2021).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 2 статьи в сборниках докладов и тезисов, 1 патент.

Личный вклад соискателя. Результаты экспериментальных исследований получены автором лично, Соискателю принадлежат разработка программы исследования и проведение основных экспериментов, теоретическое обобщение полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 133 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 23 таблицы, 8 рисунков, заключения, списка принятых сокращений, библиографического списка, включающего 182 источника, в том числе 171 на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2019-2021 годах в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Растительный материал. В качестве растений-доноров микроспор использовали 82 образца растений рода *Brassica*, включая 5 образцов *B. napus* L., и разновидности *B. oleracea* L.: 56 образцов капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.); 4 образца капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.); 12 образцов капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck); 5 образцов капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala* DC.), предоставленные ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева».

Посев семян капусты белокочанной, листовой, кольраби производили в рассадной теплице в два срока: весной (март-апрель) и в середине лета (начало июля), а у капусты брокколи и рапса – в конце лета (август), затем

готовую рассаду капусты белокочанной, листовой и кольраби пересаживали в открытый грунт. Осенью здоровые, хорошо сформированные растения пересаживали в зимнюю теплицу для яровизации ($6-10^{\circ}\text{C}$). После прохождения яровизации для стимулирования растений к цветению температуру воздуха повышали до $15-20^{\circ}\text{C}$. После распускания первых цветков с растений отбирали бутоны в течение двух недель.

Культивирование изолированных микроспор. Для определения стадии развития микроспор использовали флуоресцентную микроскопию при окрашивании клеток красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Изоляцию и культивирование микроспор, находящихся в поздней одноядерной стадии развития, проводили по методике Custers et al. (2003), Монахос (2014). Эмбриогенную отзывчивость образцов оценивали по следующей шкале: число эмбриоидов в пересчете на 100 бутонов 0 шт./100 бут. – образец неотзывчивый; 1-250 шт./100 бут. – низко отзывчивый; 251-500 шт./100 бут. – средне отзывчивый; ≥ 501 шт./100 бут. – высоко отзывчивый.

Для изучения факторов, оказывающих влияние на частоту эмбриогенеза, образования проростков из эмбриоидов и прямого прорастания эмбриоидов в культуре изолированных микроспор, проведена серия опытов. В качестве контроля во всех экспериментах использовали среду NLN-13 и тепловой шок из стандартной методики (Custers et al., 2003). Опыты закладывали не менее чем в 3-х кратной повторности.

1. Изучение влияния антиоксидантов аскорбата и глутатиона на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проведено с использованием 4 образцов капусты белокочанной. Варианты опыта: добавление в NLN-13 аскорбата натрия в концентрации 10 или 20 мг/л, глутатиона в концентрации 10 или 20 мг/л, а также совместное добавление 10 мг/л аскорбата натрия и 10 мг/л глутатиона.

2. Изучение влияния совместного действия цефотаксима и теплового шока $32,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ на частоту эмбриогенеза проводили на 2 образцах рапса, 1 образце капусты белокочанной и 1 образце капусты листовой. Варианты опыта: культивирование изолированных микроспор в среде NLN-13 с добавлением 50; 70 или 100 мг/л цефотаксима в течение 24; 48; 72 ч. в центрифужных пробирках, с доведением объема среды до 10 мл с последующей заменой питательной среды на NLN-13 без цефотаксима и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм.

3. Изучение влияния совместного эффекта путресцина и теплового шока $32,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ на частоту эмбриогенеза проводили на 1 образце капусты белокочанной и 1 образце рапса. Варианты опыта: культивирование

изолированных микроспор в среде NLN-13 с добавлением 0,2 и 0,5 мг/л путресцина в течение 24 и 48 ч. в центрифужных пробирках, с доведением объема среды до 10 мл с последующей заменой питательной среды на NLN-13 без путресцина и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм.

4. Изучение влияния совместного действия на эмбриогенез сочетания культивирования микроспор на растворах, содержащих 130 г/л сахарозы, 130 г/л мальтозы или 50 г/л маннитола, и теплового шока $32,5 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ в течение 24 ч. было проведено на 1 образце рапса, 2 образцах капусты листовой и 2 образцах капусты белокочанной. Варианты опыта: культивирование изолированных микроспор в растворах, содержащих 130 г/л сахарозы, 130 г/л мальтозы или 50 г/л маннитола, при температуре $32,5 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ в течение 24 ч. в центрифужных пробирках, с доведением объема растворов до 10 мл с последующей заменой указанных растворов на NLN-13 с pH 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм.

5. Изучение влияния на эмбриогенез изоляции и инкубирования микроспор в растворе, содержащем 130 г/л сахарозы, и теплового шока $32,5 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ в течение 48 ч. было проведено на 7 образцах капусты белокочанной. Варианты опыта: изоляция и очистка микроспор с заменой среды В5 на раствор 130 г/л сахарозы и последующим инкубированием в растворах, содержащих 130 г/л сахарозы, при температуре $32,5 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ в течение 48 ч. в центрифужных пробирках, с доведением объема раствора сахарозы до 10 мл с последующей заменой на NLN-13 с pH 5,8 и культивированием в чашках Петри диаметром 60 мм.

Проращивание эмбриоидов, регенерация проростков.

Проращивание эмбриоидов, регенерацию проростков проводили в климатической комнате при 24°C и фотопериоде 16 часов день, 8 часов ночь на среде В5 (Gamborg et al., 1968) с добавлением 11 г/л агара, 2,5% сахарозы. Плотность размещения эмбриоидов составляла 9 шт. на 1 контейнер (8×6×4,5 см).

Изучение влияния температуры 5°C и темноты на стимуляцию прямого прорастания эмбриоидов проводили с использованием 1 образца капусты кольраби. Варианты опыта: культивирование эмбриоидов сразу после пересадки на твердую питательную среду при 5°C в темноте в течение 3; 6; 9; 12 и 15 дней; культивирование эмбриоидов сразу после пересадки на твердую питательную среду при 24°C в темноте в течение 3 и 6 дней; контроль – культивирование эмбриоидов сразу после пересадки на твердую питательную среду при 24°C и фотопериоде 16 часов день, 8 часов ночь.

Сформировавшиеся растения укореняли и адаптировали в кассетах с торфяным субстратом, поддерживая в течение 3-х дней высокую влажность.

Определение пloidности растений-регенерантов. Пloidность растений определяли подсчетом числа хромосом микроскопированием препаратов, приготовленных методом «Steam Drop» (Kirov et al., 2015) из корневых меристем.

Статистическая обработка. Оценку существенности различий вариантов опыта на уровне значимости $P \leq 0,05$ проводили с использованием U-теста Манна-Уитни, при этом значения, указанные в процентах, преобразовывали с помощью функции \arcsin . Для выявления и оценки тесноты связи между показателями применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для качественной характеристики тесноты связи применяли шкалу Чеддока.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние генотипа донорного растения *Brassica* на выход эмбриоидов в культуре изолированных микроспор. Оценку генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости растений *Brassica* в культуре изолированных микроспор проводили с использованием 82 образцов. Все образцы капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala*), около 75,4% образцов капусты белокочанной (var. *capitata*), 60-67% образцов капусты брокколи (var. *italica*) и рапса (*B. napus*), 50% образцов капусты кольраби (var. *gongylodes*) являются низко отзывчивыми и неотзывчивыми.

Отмечено сходство соотношения отзывчивых образцов капусты белокочанной к неотзывчивым: 63,6/36,4% для группы гомозиготных образцов (ЛУГ, инбредные линии) и 50/50% для группы гетерозиготных образцов (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности). Соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым составило для группы гомозиготных 27,3/72,7% и 24,5/75,5% для группы гетерозиготных генотипов.

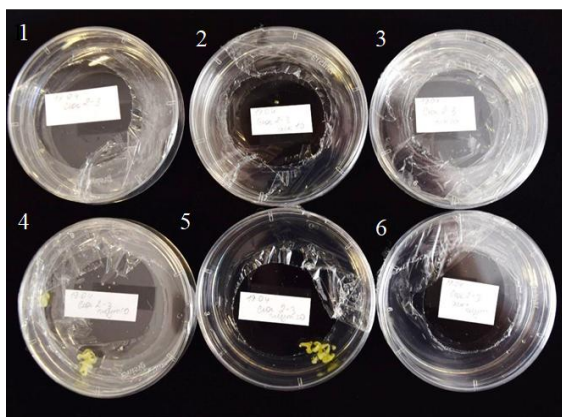
Влияние генотипа донорного растения *Brassica* на выход растений-регенерантов в культуре изолированных микроспор. В среднем частота образования проростков из эмбриоидов капусты белокочанной составила 57,9%, у капусты кольраби – 71,8%, у капусты брокколи – 81,7%, у рапса – 69,9%, что в целом выше, чем в работах других авторов. Максимальную частоту прямого прорастания эмбриоидов 62,1% наблюдали у капусты брокколи, в тех же условиях частота прямого прорастания эмбриоидов капусты белокочанной, кольраби и рапса варьировала от 19,3% до 31,9%.

Нами было установлено, что чем больше морфологически зрелых эмбриоидов формируется у образцов растений рода *Brassica*, тем выше число эмбриоидов с прямым путем прорастания ($r=0,87$). При этом у аномально

развитых эмбриоидов наблюдали вторичный эмбриогенез и органогенез, что приводит к увеличению времени и, как следствие, стоимости и трудоемкости процесса культивирования, смещению сроков яровизации и цветения капустных растений.

Изучение влияния антиоксидантов на жизнеспособность микроспор и частоту микроспорогенного эмбриогенеза *B.oleracea*. В среде с добавлением аскорбата натрия (20 мг/л) и глутатиона (20 мг/л) мы наблюдали большую, по сравнению с контролем, долю жизнеспособных микроспор изученных образцов *B.oleracea* после инкубации в условиях иницирующего стресса, при этом в контроле у всех образцов доля жизнеспособных микроспор после 7 дней культивирования снижалась в среднем в 2,5 раза (с 81 до 29%), в то время как в среде с антиоксидантами – в 1,5 раза (с 81 до 50%).

Добавление в питательную среду NLN-13 аскорбата в количестве 10 мг/л не оказывало существенного влияния, тогда как 20 мг/л аскорбата вызывало повышение частоты эмбриогенеза у половины образцов в 1,5 раза. Добавление 10 мг/л глутатиона не повлияло на частоту эмбриогенеза отзывчивых образцов, однако стимулировало эмбриогенез у неотзывчивого Сюг2-3 (рис. 1). В среде NLN-13 с концентрацией глутатиона 20 мг/л наблюдали значимое увеличение частоты эмбриогенеза у всех изученных образцов: в 1,7 раза у отзывчивых, и до $8 \pm 1,5$ шт./ч.Петри у неотзывчивого образца. В среде NLN-13 с 10 мг/л аскорбата и 10 мг/л глутатиона выход



эмбриоидов у отзывчивых образцов увеличился в 2 раза.

Рисунок 1 – Эмбриоиды образца Сюг2-3 на 30-й день после изоляции: 1) 0 мг/л аскорбата натрия и 0 мг/л глутатиона; 2) 10 мг/л аскорбата натрия; 3) 20 мг/л аскорбата натрия; 4) 10 мг/л глутатиона; 5) 20 мг/л глутатиона; 6) 10 мг/л аскорбата натрия и 10 мг/л глутатиона.

Изучение влияния на частоту эмбриогенеза теплового шока микроспор при добавлении в среду цефотаксима. Частота эмбриогенеза изученных образцов растений рода *Brassica* в вариантах с иницирующим стрессом длительностью 24, 48 или 72 ч. в среде без добавления цефотаксима значимо не изменялась. Лучшим вариантом для образцов рапса была инкубация при $32,5^{\circ}$ С в среде, содержащей 50 мг/л цефотаксима, в течение 48 часов (рис. 2). После инкубации при $32,5^{\circ}$ С в среде с цефотаксимом (50 мг/л) наблюдали индукцию эмбриогенеза неотзывчивого образца капусты

белокочанной, в то же время образец капусты листовой был неотзывчивым во всех вариантах опыта.

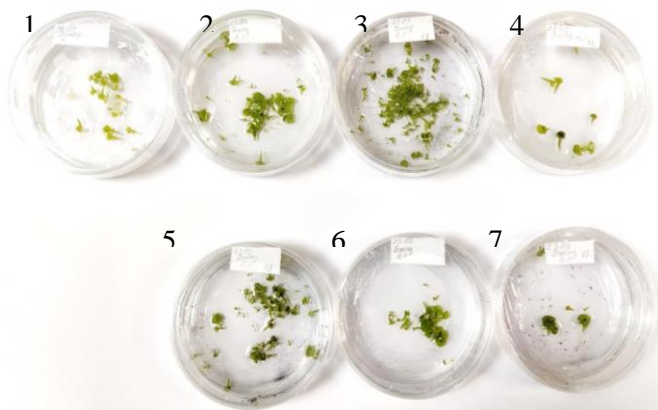


Рисунок 2 – Эмбриониды образца рапса Джаз на 30 день после изоляции, сформировавшиеся в различных вариантах опыта: 1) контроль; 2) 50 мг/л цефотаксима в течение 24 часов; 3) 50 мг/л цефотаксима в течение 48 часов; 4) 50 мг/л цефотаксима в течение 72 часов; 5) 70 мг/л цефотаксима в течение 24 часов; 6) 70 мг/л цефотаксима в течение 48 часов; 7) 70 мг/л цефотаксима в течение 72 часов.

Наибольшие значения частоты образования проростков (87,9-91,7%) и частоты прямого прорастания эмбрионидов (57,9-60%) у образцов рапса получили после инкубации микроспор в условиях температурного шока в среде с 50 мг/л цефотаксима в течение 24 и 48 часов.

Наибольшие значения частоты образования проростков (87,9-91,7%) и частоты прямого прорастания эмбрионидов (57,9-60%) у образцов рапса получили после инкубации микроспор в условиях температурного шока в среде с 50 мг/л цефотаксима в течение 24 и 48 часов.

Изучение влияния совместного эффекта полиамина путресцина и теплового шока на частоту эмбриогенеза. При добавлении путресцина (0,2; 0,5 мг/л) в условиях температурного шока (24 или 48 ч.) в среду NLN-13 наблюдали появление эмбрионидов неотзывчивого образца капусты белокочанной Б25Ки. Наибольшая частота эмбриогенеза образца Б25Ки была отмечена при культивации микроспор в среде с путресцином в концентрации 0,2 мг/л при воздействии теплового шока ($32,5^{\circ}\text{C}$) в течение 24 часов (рис. 3). Обработка путресцином не оказала существенного влияния на частоту эмбриогенеза микроспор образца рапса Джаз. Частота эмбриогенеза изученных образцов в варианте среды без путресцина значительно не изменялась в зависимости от времени инкубации в условиях теплового шока.

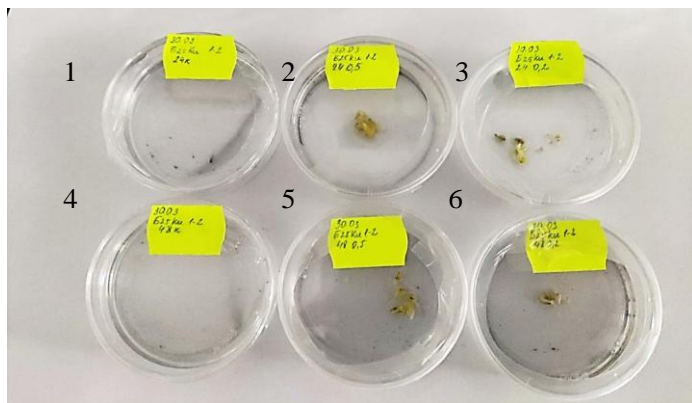


Рисунок 3 – Эмбриониды образца Б25Ки на 30 день после изоляции, сформировавшиеся в различных вариантах опыта: 1) 0 мг/л путресцина $32,5^{\circ}\text{C}$, 24 ч.; 2) 0,5 мг/л путресцина $32,5^{\circ}\text{C}$, 24 ч.; 3) 0,2 мг/л путресцина $32,5^{\circ}\text{C}$, 24 ч.; 4) контроль, $32,5^{\circ}\text{C}$, 48 ч.; 5) 0,5 мг/л путресцина $32,5^{\circ}\text{C}$, 48 ч.; 6) 0,2 мг/л путресцина, $32,5^{\circ}\text{C}$, 48 ч.

путресцина $32,5^{\circ}\text{C}$, 48 ч.; 6) 0,2 мг/л путресцина, $32,5^{\circ}\text{C}$, 48 ч.

Изучение влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза. При инкубировании в условиях иницирующего стресса микроспор всех образцов в растворах, содержащих мальтозу и маннитол, формирования эмбриоидов не происходило. В то же время частота эмбриогенеза образца рапса при инкубации во время температурного шока (24 часа) в растворе сахарозы была в 2,3 раза выше, чем при инкубации в среде NLN-13 (рис. 4).

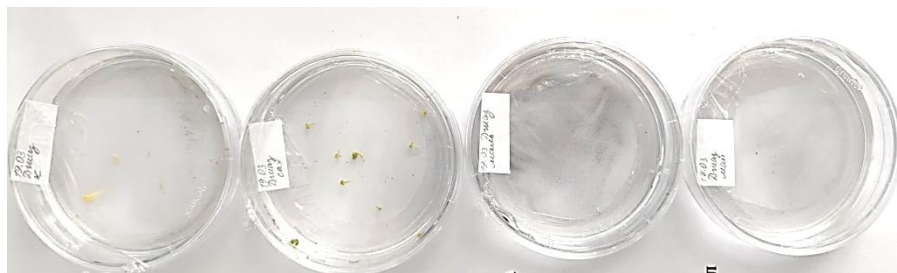


Рисунок 4 – Эмбриоиды образца Джаз (*B.napus*), сформировавшиеся на 30-й день культивирования

после инкубирования в течение 24 часов при 32,5⁰ С в среде NLN-13 и растворах, содержащих сахарозу, мальтозу, маннитол (слева направо)

Установлено отсутствие значимых различий между частотами эмбриогенеза микроспор в питательной среде и растворе сахарозы при очистке и изоляции с последующим инкубированием при 32,5⁰ С образца капусты листовой в течение 24 ч., образцов капусты белокочанной – 48 ч. (рис. 5).

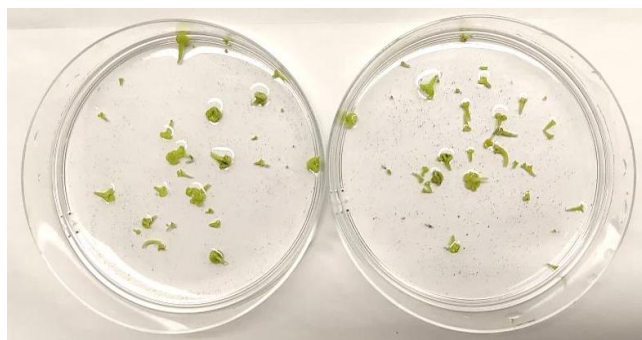


Рисунок 5 – Эмбриоиды образца 101ф3х15дг1 (*B.oleracea*), сформировавшиеся на 30-й день после изоляции, очистки и инкубации 48 часов при 32,5⁰ С в среде NLN-13; 13% растворе сахарозы (слева направо)

Значимых различий частот образования проростков, прямого прорастания и спонтанного удвоения гаплоидов у изученных образцов в зависимости от изоляции и инкубирования во время температурного шока в растворе сахарозы или питательной среде также выявлено не было.

Изучение влияния условий культивирования эмбриоидов при пониженной температуре в темноте. При культивировании эмбриоидов в темноте при 24⁰ С в течение 3 и 6 дней частота прямого прорастания составила 36,1 и 41,7% соответственно и значимо не отличалась от контроля. Инкубирование эмбриоидов после пересадки на твердую среду при температуре 5⁰ С в темноте в течение 3, 6 и 9 дней увеличило частоту прямого прорастания эмбриоидов с 44,4 до 86,1-91,7% по сравнению с



контролем. Более длительное инкубирование при 5° С в темноте (12-15 дней) привело к снижению частоты прямого прорастания эмбриоидов (рис. 6). Рисунок 6 – Проростки образца (Кор17хКор2фКи)2-1 через 3 недели культивации после холодной обработки эмбриоидов при 5° С в темноте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор отмечено, что гомозиготные генотипы (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготные генотипы (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B.oleracea*) имеют равное соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым образцам, 27,3/72,7% и 24,5/75,5%, соответственно; соотношение отзывчивых генотипов к неотзывчивым по каждой группе также имело сходство – 63,6/36,4% для группы гомозиготных и 50/50% для группы гетерозиготных генотипов. При этом степень эмбриогенной отзывчивости изученных коллекций образцов видов и подвидов *Brassica* в целом соответствует данным по отзывчивости растений *B. napus*, *B. oleracea* var. *capitata*, var. *gongylodes*, var. *italica* в ранее проведенных исследованиях других авторов.

Показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* зависит от генотипа и варьирует от 57,9% до 81,7%. Установлено, что прямое прорастание характерно для морфологически зрелых эмбриоидов, показана высокая положительная связь ($r = 0,87$) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. В результате исследования, установлена максимальная частота прямого прорастания эмбриоидов на уровне 62,1% для капусты брокколи (*B.oleracea* var. *italica*), в тех же условиях частота прямого прорастания у капусты белокочанной (var. *capitata*), кольраби (var. *gongylodes*) и рапса (*B.napus*) варьировала от 19,3% до 31,9%.

Выявлено, что в среде NLN-13 с антиоксидантами (аскорбат натрия, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) жизнеспособность изолированных микроспор

капусты белокочанной через 7 дней культивирования на 20% выше по сравнению с жизнеспособностью микроспор, культивируемых в стандартной (контрольной) среде. При этом добавление в питательную среду глутатиона (20 мг/л) влечет существенное (в 1,7 раза) повышение частоты микроспорогенного эмбриогенеза отзывчивых генотипов и способствует эмбриогенезу неотзывчивого генотипа *B. oleracea*.

Добавление в питательную среду NLN-13 антибиотика цефотаксима (50 мг/л) на этапе теплового шока изолированных микроспор рапса (*B. napus* L.) в течение 1-2 суток с последующей заменой и культивированием микроспор на питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) существенно (в 3-7 раз) повышает частоту эмбриогенеза, увеличивает частоту образования проростков до 91,7% и стимулирует прямое прорастание эмбриоидов на твердой питательной среде до 60%.

Показано, что инкубирование микроспор при температуре 32,5⁰ С в течение 24, 48 часов в среде с 0,2-0,5 мг/л полиамина путресцина не влияет на частоту эмбриогенеза, прорастания/регенерации эмбриоидов рапса (*B. napus*), однако стимулирует эмбриогенез и способствует получению растений-регенерантов генотипа капусты белокочанной (*B. oleracea*) неотзывчивого к эмбриогенезу при культивации микроспор по стандартной методике.

Установлено, что инкубирование микроспор рапса (*B. napus* L.) при температуре 32,5⁰ С в течение 24 часов в 13% растворе мальтозы и 5% растворе маннитола полностью ингибирует эмбриогенез микроспор, а инкубирование микроспор в растворе сахарозы (130 г/л) во время тепловой обработки (32,5⁰ С; 24 часа) увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ рапса (в 2,3 и 2 раза соответственно), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ капусты белокочанной и листовой.

Выявлено, что использование 13%-го раствора сахарозы вместо среды В5 на этапе изоляции и очистки микроспор и вместо среды NLN-13 на этапе теплового шока не приводит к снижению частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации, соответственно не приводит к снижению выхода удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор по сравнению со стандартным протоколом.

Показано, что обработка низкими положительными температурами (5⁰ С) эмбриоидов кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в полной темноте в течение 3, 6, 9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза по сравнению с культивацией эмбриоидов при 24⁰ С с фотопериодом 16/8 ч.

день/ночь (контроль) и при 24⁰ С в темноте, при этом частота образования проростков достигает 94,4-97,2 %.

Рекомендации производству

1. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор для повышения частоты эмбриогенеза культивируемых микроспор рекомендуется использовать среду NLN-13 с добавлением 20 мг/л глутатиона.

2. В производстве линий удвоенных гаплоидов рапса в культуре изолированных микроспор для повышения частоты эмбриогенеза и культивируемых микроспор и прямого прорастания сформировавшихся эмбриоидов рекомендуется во время теплового шока (32,5±0,1⁰ С в течение 48 ч.) использовать среду NLN-13, содержащую 50 мг/л цефотаксима.

3. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор для изоляции, очистки и инкубирования микроспор в условиях иницирующего стресса (32,5±0,1⁰ С в течение 48 ч.) рекомендуется использование 13% раствора сахарозы, что позволяет существенно снизить трудоемкость и расход химических реактивов.

4. В производстве линий удвоенных гаплоидов капусты кольраби в культуре изолированных микроспор для стимуляции прорастания эмбриоидов рекомендуется использовать обработку низкими положительными температурами (5⁰ С) в течение 3-6 дней.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. Сеницына, А.А. Влияние условий культивирования на частоту прорастания/регенерации микроспорогенных эмбриоидов *Brassica oleracea* L. Effect of cultivation conditions on the germination/regeneration frequency of microsporogenic embryos *Brassica oleracea* L. / А.А. Сеницына, А.В. Вишнякова, А.А. Александрова, С.Г. Монахос // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy: Научно-теоретический журнал Российского государственного аграрного университета - МСХА имени К.А. Тимирязева. – 2021. – № 5. – С. 39-55.

2. Сеницына, А.А. Сравнительная оценка выхода удвоенных гаплоидов *Brassica oleracea* var. *capitata* L. и *Brassica napus* L. в культуре изолированных микроспор / А.А.Сеницына, А.В. Вишнякова, С.Г. Монахос// Картофель и овощи. – 2022. – №4. – С. 13-16.

Авторские свидетельства, патенты и др.

3. Патент № 2769815 Российская Федерация, СПК А01Н 4/00 (2022.02). Способ создания удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор : № 2021121319 : заявл. 19.07.2021 : опубликовано 06.04.2022, Бюл. № 10 / Вишнякова А.В., Монахос С.Г., Сеницына А.А. ; патентообладатель ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Работы в прочих изданиях

4. Сеницына, А.А. Изучение влияния холодной обработки на эмбриониды капусты кольраби, полученные в культуре микроспор / А.А.Сеницына, А.В. Вишнякова // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвященная 160-летию В.А. Михельсона, г. Москва, 9-11 июня 2020 г.: Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, – 2020. – С. 232-236.

5. Сеницына, А.А. Изучение влияния типа углеводов в эмбриоиндукционной среде на частоту эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной (*B.Oleracea* L.) / А.А.Сеницына, А.В. Вишнякова // Всероссийская с международным участием научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова, г. Москва, 7-9 июня 2021 г.: Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, – 2021. – С. 308-312.