

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА  
(*BRASSICA NAPUS*) IN VITRO

МАИ ДЫК ЧУНГ, Е.А. КАЛАШНИКОВА, А.А. СОЛОВЬЕВ

(Кафедра биотехнологии, кафедра генетики)

**Оптимизированы условия культивирования изолированных пыльников и микроспор с целью получения гаплоидных растений рапса в условиях *in vitro*. Установлено, что присутствие в питательной среде  $B_5$  гормонов кинетин 1 мг/л и НУК 1 мг/л стимулировало процесс прямого эмбриогенеза, а также образование вторичных и третичных эмбрионов на гипокотильных и листовых сегментах стерильных проростков. Проведенный цитологический анализ растений-регенерантов подтвердил их гаплоидную природу.**

**Ключевые слова:** рапс, гаплоидные растения, культура микроспор, изолированные пыльники, эмбриогенез, *in vitro*.

Важным направлением современной селекции является создание улучшенных и принципиально новых генотипов с.-х. растений, обладающих единичной, групповой или комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды при сохранении и повышении их продуктивности и качества. Рациональное сочетание методов классической селекции с биотехнологическими методами позволяет решать поставленные задачи в более короткий срок.

Использование методов клеточной и тканевой биотехнологии в селекции облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс создания новых форм и сортов растений. Одним из таких методов является метод, направленный на получение гаплоидных растений *in vitro*, позволяющий быстро получать генетически стабильные гомозиготные линии. Обычно для индукции гаплоидии используют традиционные методы — отдаленную гибридизацию, обработку фитогормонами, создание стрессовых условий и др. Однако данные приемы трудоемки, требуют много времени и неэффективны вследствие низкого ко-

эффициента выхода гаплоидных растений. Для увеличения эффективности индуцирования гаплоидов используют следующие методы культивирования *in vitro*: 1) андрогенез в культуре пыльников и пыльцы; 2) гиногенез в культуре изолированных семязачек и 3) партеногенез в культуре гибридного зародыша, у которого утрачены отцовские хромосомы [2, 5, 6].

Метод культуры изолированных пыльников и микроспор — один из перспективных способов получения гаплоидных растений. Культура микроспор и пыльцы является удобным экспериментальным объектом для фундаментальных исследований, касающихся регенерации в одноклеточных системах. Кроме того, правильный подбор условий культивирования, обеспечивающих дифференцировку эмбрионов из микроспор, и сравнение этого процесса с процессом формирования соматических и зиготических зародышей является предметом биохимических и морфологических исследований, а также опытов по изучению молекулярных механизмов, специфичных для эмбриогенеза. Потенциальные возможности теоре-

тического и прикладного применения метода культуры пыльников и микроспор выходят за рамки гаплоидной селекции. Так, удвоенные гаплоидные растения могут быть с успехом использованы при выборе мутантов из клеточных структур. Эффективность мутагенеза на гаплоидном уровне очевидна, так как для диплоидных клеток на одном и том же локусе необходима двойная мутация, а для гаплоида достаточно сосредоточить мутацию в одном локусе с последующим удвоением хромосом [2].

Получение растения из микроспор в культуре пыльников является наиболее распространенным методом создания гомозиготных линий у многих видов *Brassica*. Авторы, как правило, проводили исследования по получению гаплоидных растений на определенном этапе андрогенеза, а именно на условиях выращивания донорных растений, предварительной их обработки пониженной температурой или биологически активными веществами, изучали зависимость морфогенеза от генотипических особенностей растения-донора, стадии развития микроспор в пыльнике, состава питательной среды и условий культивирования пыльников, а также другие условия, стимулирующие андрогенез [1, 7, 8]. Результаты исследований показали, что до сих пор эмбриогенез в культуре пыльников *in vitro* различных видов *Brassica* происходит спонтанно и предлагаемые технологии трудно воспроизводимы и недостаточно изучены на каждом этапе андрогенеза. Поэтому разработку и усовершенствование существующих методических подходов необходимо проводить для каждого конкретного генотипа.

### Материал и методы исследований

В работе использовали сорт Hans и гибриды F<sub>1</sub> рапса *Brassica napus* (WF x F<sub>1</sub> Titan, Галиция x TGI). Рас-

тения-доноры выращивали в теплице Овощной опытной станции имени В.И. Эдельштейна РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева в течение года. Работу проводили на бутонах, которые изолировали как с главного, так и боковых побегов. Соцветия помещали в стакан с водой и подвергали Холодовой предобработке при температуре 4~6°C в бытовом холодильнике в течение 16 ч. После этого бутоны стерилизовали 0,1%-м раствором сулемы в течение 4 мин и многократно отмывали стерильной дистиллированной водой. Пыльники асептически извлекали из бутонов под бинокулярной лупой и переносили на индуцирующую среду В<sub>5</sub>, содержащую сахарозу 3%, а также гормоны, обладающие цитокининовой и ауксиновой активностью. В качестве цитокининов изучали БАП, кинетин, 2ip в концентрации от 0,5 до 1,5 мг/л, в качестве ауксинов — 2,4-Д, НУК, ПУК в концентрации 0,5~2,0 мг/л. Изучали влияние консистенции питательной среды (твердая, полужидкая и жидкая), а также сочетание жидкой и твердой сред (двухслойная среда) на процесс эмбриогенеза. Культивирование полученных эмбриоидов и растений-регенерантов осуществляли на питательной среде МС.

Чашки Петри с растительным материалом помещали в термостат и инкубировали при температуре 35°C в течение 24 ч с последующим переносом их в обычные условия культивирования (температура 25°C, 16-часовой фотопериод и освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 5 тыс. лк). В опытах придерживались правил работы в стерильных условиях, разработанных на кафедре с.-х. биотехнологии [3]. Цитологические исследования по подсчету хромосом и числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц проводили в соответствии с практикумом по цитологии и цитогенетике растений [4].

## Результаты и их обсуждение

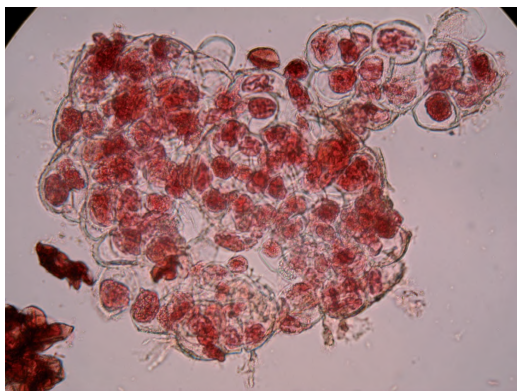
Проведенные исследования показали, что культивирование пыльников и микроспор на среде, содержащей кинетин 1 мг/л и НУК 1 мг/л, приводило к сильному образованию вакуолизированных клеток пыльников и микроспор. Причем освобожденные от соматических тканей пыльника микроспоры на твердой среде начинают делиться и формировать эмбриониды, которые в дальнейшем развивались в растения (рис. 1). Несмотря на не-

высокую частоту соматического эмбриогенеза, которая составила лишь 1%, среднее число индуцированных эмбрионидов на один пыльник было 16-25 шт. Причем данный процесс происходил асинхронно (рис. 2).

В дальнейшем сформированные эмбриониды отделяли от первичного экспланта и друг от друга и переносили в пробирки на среды, содержащие минеральные соли по МС, а также разные гормоны и концентрации агар-а: 1) твердая безгормональная среда МС с сахарозой — 2%, агар — 8 г/л;

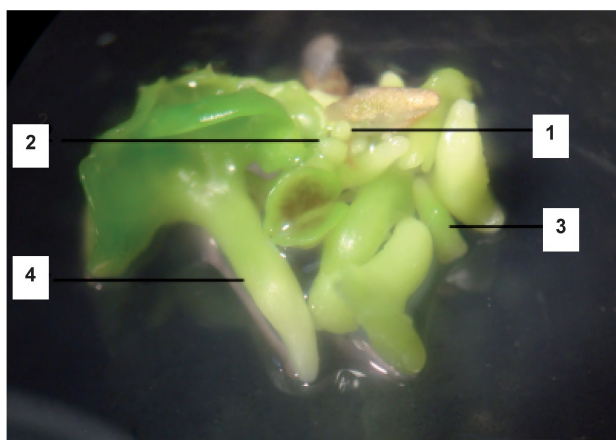


а



б

**Рис. 1.** Процесс формирования эмбрионидов из изолированных микроспор: а — образование вакуолизированных клеток, б — образование эмбрионидных структур



**Рис. 2.** Асинхронное формирование эмбрионидов: 1 — глобулярная стадия, 2 — сердцевидная стадия, 3 — стадия торпеды, 4 — проросток

2) жидкая безгормональная среда МС с применением фильтровальной бумаги (на мостиках) с сахарозой — 2%; 3) твердая среда МС с сахарозой — 2%, агар — 8 г/л, ИУК — 0,5 мг/л, БАП — 0,5 мг/л.

Исследования показали, что быстрое развитие эмбриоидов в проростки происходило на агаризованной питательной среде, содержащей гормоны, в то время как в жидких условиях культивирования (на мостиках) сначала развивалась корневая система, а затем гипокотильная часть проростка (рис. 3).

При длительном культивировании растений в условиях жидкой среды наблюдалось вторичное образование эмбриоидов, которые формировались из эпидермальных клеточных слоев гипокотилиа и черешков, а также из нижней стороны листовых пластинок проростков (рис. 4).

Сформированные вторичные эмбриоиды асептически извлекали под бинокулярной лупой и переносили на индуцирующую среду МС, содержащую сахарозу — 2%, а также БАП — 0,5 мг/л, ИУК — 0,5 мг/л. В этих условиях эмбриоиды формировались в проростки, которые в дальнейшем были перенесены в почву для выращивания с целью получения растений-регенерантов (рис. 5).



а

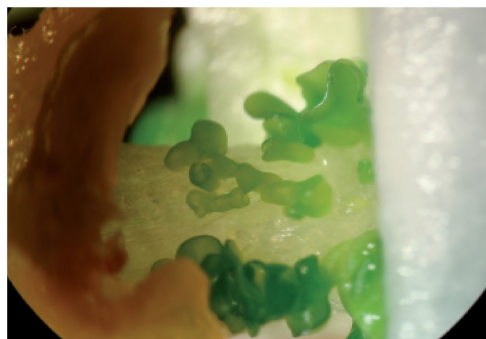
б

**Рис. 3.** Формирование растений на разных средах выращивания: а — в жидкой среде на мостиках, б — на твердой агаризованной среде

Для косвенного доказательства гаплоидного набора хромосом у полученных растений-регенерантов из изолированных пыльников рапса применен метод подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Экспериментально установлено, что количество хлоропластов в клетках устьиц гаплоидного растения составило от 10 до 15 шт., в то время как у исходных донорных растений их было от 35 до 45 шт. (рис. 6).



а

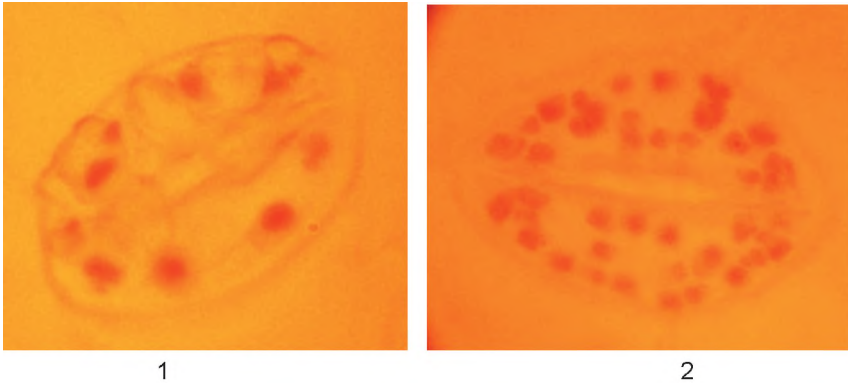


б

**Рис. 4.** Формирование вторичных эмбриоидов: а — на гипокотильном сегменте, б — в основании листовой пластинки



**Рис. 5.** Адаптированные растения-регенеранты

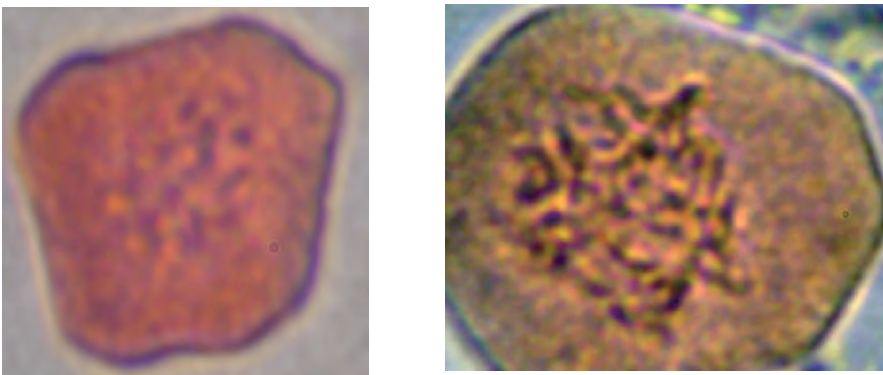


**Рис. 6.** Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц:  
1 — гаплоидные растения, 2 — диплоидные растения

Уменьшенное количество хлоропластов было также в растениях, полученных из вторичных и третичных эмбриоидов.

Прямым доказательством гаплоидной природы растений рапса явля-

ется цитологический метод подсчета хромосом в меристеме корня. Нами установлено, что у растений-регенерантов, полученных в культуре изолированных микроспор одинарный набор хромосом ( $n=19$ ) (рис. 7).



**Рис. 7.** Клетки меристем корня рапса: а — гаплоидных растений, б — диплоидных растений

Таким образом, на основании полученных данных нами были подобраны условия культивирования, обеспечивающие получение растений-регенерантов рапса из изолированных пыльников и микроспор и доказана их гаплоидная природа.

### Библиографический список

1. Домблдес Е.А., Шмыкова Н.А. Развитие пыльников капусты брокколи *in vivo* и при культивировании *in vitro* // Сб. науч. тр. Всерос.НИИ селекции и семеноводства овощных культур, 2002. Вып. 37. С. 82-92.
2. Жамбакин К.Ж. Гаплоидная биотехнология растений. Алматы, 2004.
3. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006.
4. Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бабаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетика растений. М.: КолосС, 2007.
5. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник, 3-е изд., перераб. и доп. / Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. М.: Высшая школа, 2008.
6. Шамина З.Б. Андрогенез и получение гаплоидов в культуре пыльников и микроспор // Культура клеток растений. М.: Наука, 1983. С. 124-136.
7. Dias J.C.da S. Effect of activated charcoal on Brassica oleracea microspore culture embryogenesis // Euphytica, 1999. Vol. 108. N 1. P. 65-69.
8. Godercka K., Krzyzanowska D. The influence of different factors on the effectiveness of embriogenesis in head cabbage anther culture // Vegetable crops research bull. / Research inst. of vegetable crops, 2004. Vol. 61. P. 5-12.

Рецензент — к. б. н. Г.И. Карлов

### SUMMARY

Cultivation conditions of isolated anthers, microspores and ovaries have been optimized in order to obtain haploid rape plants under *in vitro* conditions. It has been established that B<sub>5</sub> hormone kinetin presence in the nutrient medium (1 mg. per litre) stimulates the process of embryogenesis and also stimulates the forming of both secondary and tertiary embryos on hypocotyl and leaf segments of sterile sprouts. The cytologic analysis of plant regenerants performed proves their haploid origin

**Key words:** rape, haploid plants, microspores culture, isolated anthers, embryogenesis, *in vitro*.

**Май Дык Чунг** — асп. кафедры сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ - МСХ А имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-40-72.

**Калашникова Елена Анатольевна** — д.б.н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-40-72. Эл. почта: kalash0407@mail.ru.

**Соловьев Александр Александрович** — д.б.н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.976-08-94.