

2. Cristea, T. O. The influence of pH on microspore embryogenesis of white cabbage (*Brassica oleracea* L.) / T. O. Cristea // Not Sci. Biol. - 2013б. - Vol. 5. - № 4. - Pp. 485-489.
3. Custers, J. B. M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In doubled haploid production in crop plants. / J. B. M. Custers. In M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster and I. Szarejko // Kluwer. - Academic Publisher, 2003. - Pp. 185-194.
4. Shariatpanahi, M. E. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. / M. E. Shariatpanahi, U. Bal, E. Heberle-Bors, A. Touraev // Physiol Plant. - 2006. - Vol. 127. - Pp. 519-534.
5. Yuan, S. X. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage / S. X. Yuan [et al.] // Plant Cell Tiss. Org. Cult. - 2012. - Vol. 110. - Pp. 69-76.
6. Байдина, А. В. Влияние pH среды на эмбриогенез в культуре микроспор у капустных культур [Текст] / А. В. Байдина // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов «Наука молодых – агропромышленному комплексу», г. Москва, 1-3 июня 2016: сборник статей. - М. : Изд-во РГАУ-МСХА, 2016. - С. 241-242.
7. Байдина, А. В. Методы активации перехода микроспор *Brassica oleracea* L. с гаметофитного на спорофитный путь развития [Текст] / А. В. Байдина // Материалы международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвященной 150-летию со дня рождения В.П. Горячкина. - М. : Издательство РГАУ-МСХА, 2018. - С. 116-119.

УДК 57.085.23

## **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТИПА УГЛЕВОДОВ В ЭМБРИОИНДУКЦИОННОЙ СРЕДЕ НА ЧАСТОТУ ЭМБРИОГЕНЕЗА МИКРОСПОР КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*B. OLERACEA* L.)**

*Синицына Анастасия Александровна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, sinitsyna@inbox.ru*

*Вишнякова Анастасия Васильевна, к.с.-х.н., ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, a.vishnyakova@rgau-msha.ru*

**Аннотация:** Целью исследования было изучение влияния типа углеводов в эмбриоиндукционной среде NLN в концентрации 130 г/л на частоту эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной. В ходе работы мы сравнивали дисахариды (сахарозу и мальтозу) и моносахариды (маннозу, глюкозу, галактозу, фруктозу). Формирование эмбрионидов наблюдали только на питательных средах, содержащих дисахариды – сахарозу или мальтозу.

**Ключевые слова:** капуста белокочанная, культура микроспор, частота эмбриогенеза, углеводы.

Частота эмбриогенеза и формирования удвоенных гаплоидов (УГ) в культуре изолированных микроспор у капусты белокочанной, как правило, ниже, чем у других растений рода *Brassica*: капусты цветной, брокколи, капусты пекинской, рапса [5].

Вопрос повышения частоты эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной является ключевым для рутинного использования УГ-технологии в селекционных программах по созданию F1-гибридов [4]. Подбор оптимальных для каждого генотипа условий культивации, в том числе, состава среды, позволяет получить максимально возможную частоту эмбриогенеза генотипов капустных культур [1].

В состав среды для культивации микроспор входят сахара, являющиеся регулятором осмотического давления и источником углерода, и для капустных культур в питательную среду чаще всего добавляют сахарозу [6]. При изучении влияния типа углевода в среде на частоту эмбриогенеза капусты белокочанной Cristea et al. (2013) сравнивали дисахариды (сахароза и мальтоза) и моносахариды (фруктоза и глюкоза) в концентрации 60, 130 и 200 г/л. Эмбриогенная отзывчивость микроспор была в разы ниже при содержании в среде моносахаридов, чем при добавлении дисахаридов, при этом на среде с сахарозой количество эмбриоидов было существенно меньше, чем на среде с мальтозой [2].

Целью нашей работы стало изучение влияния типа углеводов в эмбриоиндукционной среде NLN в концентрации 130 г/л на частоту эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной. В ходе работы мы сравнивали дисахариды (сахарозу и мальтозу) и моносахариды (маннозу, глюкозу, галактозу, фруктозу).

### **Материалы и методы**

#### **Растения доноры и условия выращивания**

Для изоляции микроспор капусты белокочанной использовали 2 линии удвоенных гаплоидов: Фрг47, Плг и 3 линии первого и второго поколения инбридинга: Гэс, Аут, ПлКи. Используемые для введения в культуру микроспор растения капусты белокочанной выращивали в теплице селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева. Яровизацию растения проходили в защищенном грунте в зимний период при температуре 4-6 °С.

#### **Изоляция и культивирование микроспор**

Изоляцию и культивирование микроспор проводили по методике Custers et al. (2003) с небольшими модификациями [3]. Бутоны длиной от 4,0 до 6,5 мм в зависимости от генотипа, содержащие микроспоры в поздней одноядерной стадии развития, изолировали в течение двух недель после распускания первых цветков на растении. Их стерилизовали в 2%-м гипохлорите натрия (NaOCl) с добавлением 2-3 капель Твин-20 в течение 10 минут, затем промывали 3 раза в холодной стерильной дистиллированной воде в течение 1, 5 и 10 мин. Бутоны измельчали с помощью шприцевых поршней в 60 мл бюксах, содержащих 2 мл безгормональной среды В5 с добавлением 130 г/л сахарозы, 50 г/л манитола и рН 5.8 простерилизованной в автоклаве. Суспензию микроспор фильтровали через двухслойный фильтр с диаметром ячеек 45  $\mu\text{m}$ . Фильтрат центрифугировали при температуре 4 °С в течение 4 минут 3 раза при 800 об./мин. Микроспоры ресуспендировали в среде NLN-13, концентрацию доводили до  $4 \times 10^4$  микроспор/мл. Суспензию микроспор разливали в чашки Петри диаметром 60 мм по 5 мл в каждую. Чашки Петри с суспензией микроспор культивировали в темноте в течение 48 ч. при  $32,5 \pm 1$  °С, затем – в темноте при  $25 \pm 1$  °С до появления эмбриоидов.

Изучение влияния различных типов углеводов в среде NLN-13 (рН 5,8) на частоту эмбриогенеза проведено с использованием двух дисахаридов, сахарозы и мальтозы и четырех моносахаридов, маннозы, глюкозы, галактозы и фруктозы, при добавлении в

концентрации 130 г/л. В качестве контроля использовали базовую среду NLN-13 с добавлением 130 г/л сахарозы, рН 5,8.

### Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием U-теста Манна-Уитни. Эксперименты заложены в трехкратной повторности, одна повторность соответствует 1 чашке Петри. Существенность различий между вариантами опыта определяли с использованием уровня значимости  $P \leq 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

Изучение влияния моно- (глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза) и дисахаридов (мальтоза и сахароза) на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор проводили на пяти генотипах капусты белокочанной: Гэс, Аут, Фрг47, Плг и ПлКи. Сахара добавляли в среду в одинаковой концентрации, равной 130 г/л, и сравнивали наблюдаемую частоту эмбриогенеза между разными вариантами опыта для каждого из генотипов (таблица 1).

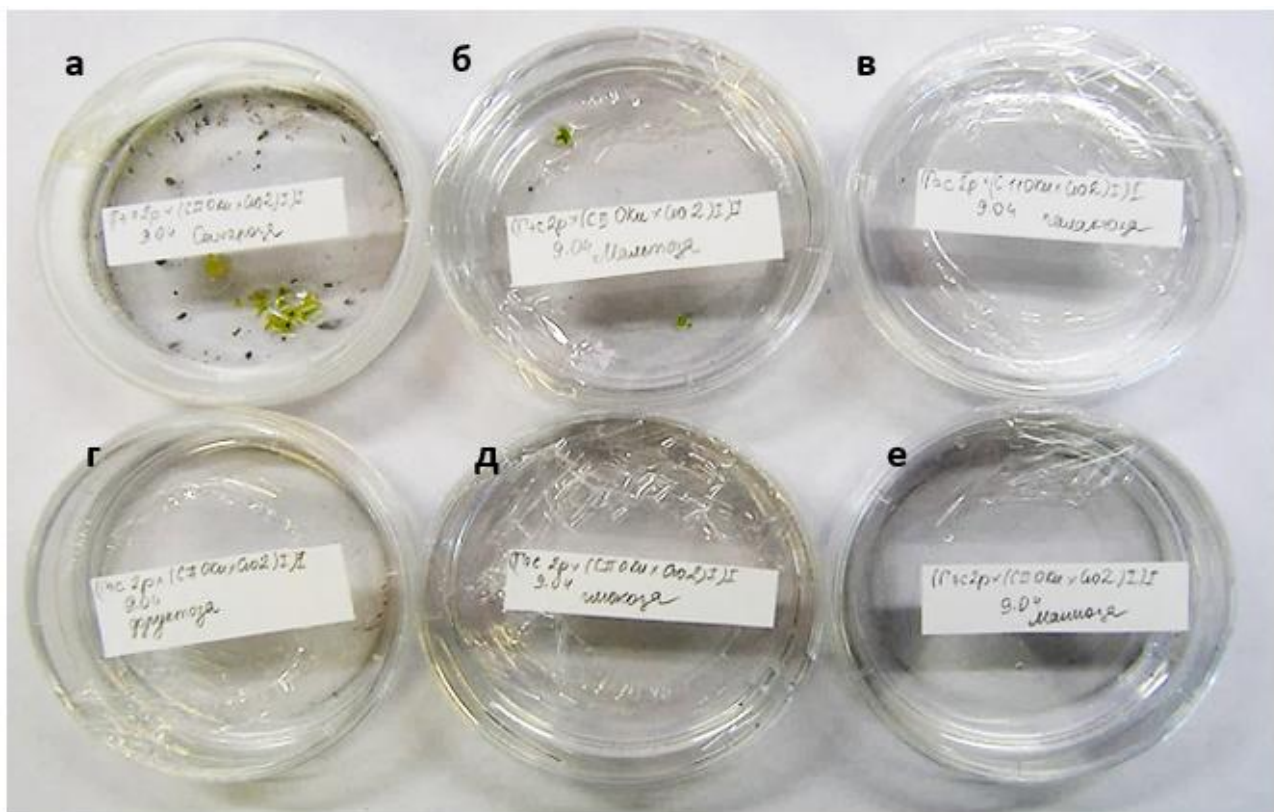
Таблица 1

### Влияние моно- и дисахаридов в питательной среде NLN-13 на частоту эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной

Генотип	Частота эмбриогенеза, шт./ч.Петри					
	Сахароза, 130 г/л	Мальтоза, 130 г/л	Манноза, 130 г/л	Глюкоза, 130 г/л	Галактоза, 130 г/л	Фруктоза, 130 г/л
Гэс	19,3±4,7a	5,0±1,1b	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c
Аут	3,0±1,1a	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
Фрг47	17,7±4,7a	4,3±3,5b	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c
Плг	1,7±1,7a	0,3±0,7a	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
ПлКи	6,0±4,9a	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b

Примечание: строчные буквы a, b, c - показывают разницу между вариантами в строке на уровне значимости  $P=0.05$ .

При культивировании микроспор на средах, содержащих моносахариды, формирования эмбриоидов не происходило. На средах содержащих дисахариды (сахарозу и мальтозу) наблюдали появление эмбриоидов у большинства генотипов. При сравнении культивирования микроспор на средах с добавлением сахарозы (130 г/л) и мальтозы (130 г/л) формирование эмбриоидов с большей частотой происходило на среде с сахарозой. У всех генотипов на среде с добавлением мальтозы формировалось значительно меньше эмбриоидов, по сравнению с культивированием микроспор этих генотипов на среде, содержащей сахарозу (рисунок 1), а генотипы Аут, ПлКи эмбриоиды не сформировали.



**Рис. 1. Количество эмбрионов генотипа Гс при культивировании микроспор на питательных средах с моно- и дисахаридами, шт./ч.Петри: а) сахароза, б) мальтоза, в) галактоза, г) фруктоза, д) глюкоза, е) манноза**

Преимущество использования мальтозы по сравнению с сахарозой и моносахаридами (фруктоза и глюкоза) было продемонстрировано в культуре изолированных микроспор злаков, картофеля и капусты белокочанной [2, 6]. Авторы связывают это с тем, что мальтоза расходуется медленнее, чем сахароза и моносахариды, поэтому при культивировании микроспор поддерживается оптимальное количество доступного кислорода, достаточное для выживания клеток в культуре. На средах с сахарозой, глюкозой и фруктозой микроспоры капустных культур, напротив, быстро метаболизируют сахара, накапливают в своих клетках большое количество этанола и крахмала, останавливают рост и, в конечном итоге, теряют жизнеспособность [2].

Djatchouk et al. (2019) считают, что при замене сахарозы на мальтозу в среде для культивации пшеницы замедленный гидролиз мальтозы способен вызвать углеводное голодание, индуцирующее эмбриогенез микроспор. В сочетании с дополнительным стрессом (высокие и низкие температуры) углеводное голодание, возникающее на средах с добавлением мальтозы, блокирует гаметофитное развитие и способствует эмбриогенному развитию микроспор [4].

Культивация на питательных средах с содержанием моносахаридов привела к потере способности микроспор к эмбриогенезу у всех генотипов в нашем опыте. Это подтверждает выводы других исследователей о том, что моносахариды не поддерживают эмбриогенез и жизнеспособность микроспор *B. oleracea* [2], хотя и эффективны для других культур, например, тритикале, хлопок [6].

На среде с добавлением, рекомендуемой другими авторами, мальтозы частота эмбриогенеза у изучаемых нами генотипов была значимо ниже, чем на среде с сахарозой.

Вероятно, эффективность использования мальтозы в среде для культивации микроспор меняется в зависимости не только от культуры, но и от генотипа растения.

### **Заключение**

Использование разных типов углеводов в среде NLN-13 показало, что моносахариды фруктоза, глюкоза, галактоза и манноза не поддерживают эмбриогенез в культуре микроспор капусты белокочанной. На среде NLN-13 с добавлением дисахаридов мальтозы и сахарозы частота эмбриогенеза у изучаемых нами генотипов на среде с мальтозой была значимо ниже, чем на среде с сахарозой. Лучшим вариантом эмбриоиндукционной среды для культивации микроспор капусты белокочанной была питательная среда NLN-13 с добавлением сахарозы.

### **Библиографический список**

1. Bhatia R., Dey S. S., Sood S., Sharma K., Parkash C., 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;216:83-92. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.12.020
2. Cristea T. O., Prisecaru M., Brezeanu C., Brezeanu M. Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18:8677-8684
3. Custers, J. B. M., Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P., Szarejko I. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). Kluwer Academic Publisher. 2003;185-194. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4\_29
4. Djatchouk T. I., Khomyakova O. V., Akinina V. N., Kibkalo I. A., Pominov A. V. Microspore embryogenesis in vitro: the role of stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466
5. Shmykova N. A., Shumilina D. V., Suprunova T. P. Doubled haploid production in *Brassica* L. seeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii - Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):111-120. DOI: 10.18699/VJ15.014
6. Silva T. D., Sato C. H. Microspore Embryogenesis, Embryogenesis. Rijeka: InTech Europe. 2012;573-591 DOI: 10.5772/37039

УДК 63.5995

### **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УГЛЕВОДОВ И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА РАЗВИТИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ (*BETA VULGARIS* L.)**

*Григолава Тамара Руслановна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, grigolava1@gmail.com*

*Монахос Сократ Григорьевич, д.с.-х.н., заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, s.monakhos@rgau-msha.ru*

**Аннотация:** Показано, что добавление в питательную среду сахарозы в качестве источника углеводов ведет к формированию эмбриоидов и каллуса у всех изученных