

ИНСТИТУТ САДОВОДСТВА И ЛАНДШАФТНОЙ АРХИТЕКТУРЫ
СЕКЦИЯ «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ САДОВОДСТВА И
ЛАНДШАФТНОЙ АРХИТЕКТУРЫ»

УДК 631.421.2

ПРОИЗВОДСТВО УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ
ВЫСОКОМАСЛИЧНОГО ЯРОВОГО РАПСА 00-ТИПА В КУЛЬТУРЕ
ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

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

Александрова Анастасия Алексеевна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: a.alexandrova@rgau-msha.ru

***Аннотация:** Методом изолированных микроспор были получены растения удвоенные гаплоиды из селекционных образцов высокомасличного ярового рапса 00-типа. Успех эмбриогенеза и частоты прямого прорастания эмбриоидов зависел от генотипа растения-донора микроспор. В результате спонтанного удвоения было получено 104 диплоидных растений четырех изученных генотипов.*

***Ключевые слова:** Культура изолированных микроспор, яровой рапс, эмбриогенез, частота прямого прорастания растений.*

Рапс – важная масличная культура. Культура изолированных микроспор считается наиболее эффективным методом получения удвоенных гаплоидов [3]. Данный метод позволяет получить линии, удвоенные гаплоиды ярового рапса всего за несколько месяцев. *V. napus* считается модельной культурой для изучения процесса эмбриогенеза микроспор из-за высокой отзывчивости некоторых генотипов [2].

В качестве доноров для изоляции микроспор были использованы высокомасличные селекционные образцы ярового рапса с низким содержанием глюкоиналатов и эруковой кислоты. Растения-доноры выращивали в климатической комнате с 16 часовым фотопериодом и при температуре 22-23 °С.

Пред тем, как производить изоляцию микроспор, определяли размеры бутонов, соответствующие одноядерной поздней стадии развития микроспор. Окрашивание производили флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). Препараты изучали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Lab.A1.

Изоляцию микроспор проводили методом, разработанным Custers et al. (2003) с модификациями. С помощью электронного штангенциркуля отбирали

бутоны, содержащие микроспоры в одноядерной стадии. Изоляцию микроспор проводили в безгормональной охлажденной среде В5 Гамборга с 13% сахарозы и 5% манитолла. Концентрацию микроспор определяли с помощью камеры Фукса-Розенталя и довели до 4×10^4 микроспор/мл.

Культивирование микроспор проводили в питательной среде NLN-13 с добавлением 130 г/л сахарозы и рН 5,8 2-е суток в темноте при температуре $32,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, далее в климатической камере при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в темноте. Чашки Петри переставляли на шейкер Excella E-24 при 70 об./мин., когда появлялись первые эмбриониды в топетовидной стадии и культивировали при освещении с 12-часовым фотопериодом.

Эмбриониды, достигшие семядольной стадии пересаживали на безгормональную регенерационную среду В5 Гамборга с добавлением 25 г/л сахарозы и 11 г/л агара, рН 5,8 по 12 эмбрионидов на контейнер. Культивировали в климатической комнате при температуре $+22^\circ\text{C}$ с 16 часовым фотопериодом. Растения-регенеранты, полностью сформировавшие корневую систему и надземную часть, пересаживали в кассеты с увлажненным субстратом. После пересадки устанавливали плоидность растений-регенерантов косвенным методом по фенотипу.

Частоту эмбриогенеза определяли для каждого генотипа отдельно в пересчете на 100 бутонов (табл.1)

Таблица 1

Частота эмбриогенеза ярового рапса

Генотип	Кол-во бутонов, отобранных для изоляции микроспор	Кол-во эмбрионидов, полученных в культуре изолированных микроспор	Эмб/100бу
1К	9	45	500
2К	15	59	393
3К	9	64	711
4К	28	540	1 929

Самую высокую частоту эмбриогенеза наблюдали у генотипа 4К и составила 1 929 эмбрионидов на 100 бутонов. Самая низкая частота эмбриогенеза составила 393 эмбрионидов у генотипа 2К.

Через 30 дней после пересадки эмбрионидов на агаризованную питательную среду для регенерации оценивали частоту прямого прорастания эмбрионидов. Данный показатель оценивали, как процентное отношение количества эмбрионидов пересаженных на регенерационную среду, к количеству растений, пересаженных в грунт на 30 день культивирования (табл.2).

Частота прямого прорастания эмбриоидов ярового рапса

Генотип	Кол-во эмбриоидов пересаженных на регенерационную питательную среду, шт	Кол-во растений-регенерантов, пересаженных в грунт на 30 день культивирования, шт.	Частота прямого прорастания эмбриоидов ярового рапса, %
1К	45	35	77,8
2К	59	53	89,8
3К	64	56	87,5
4К	236	192	81,3

У генотипа 2К частота прямого прорастания составила 89,8 %, что больше, что у остальных генотипов. Ниже всего данный показатель у генотипа 1К (77,8%). У генотипов 3К и 4К составили 87,5 и 81,3% соответственно, что не существенно отличается от генотипа с самой высокой частотой прорастания.

Некоторые исследователи утверждают, что этап регенерации очень важен в процессе получения удвоенных гаплоидов, так как у многих генотипов именно на этом этапе погибает большая часть потенциальных регенерантов [4]. В данном исследовании генотипы 1К, 2К, 3К, 4К показали высокую частоту регенерации.

Диплоидные растения отбирали по фенотипу и размножали самоопылением для получения линий удвоенных гаплоидов. У генотипа 4К было получено больше всего растений удвоенных гаплоидов (74 шт.), у генотипа 1К было получено всего одно диплоидное растение.

Для получения линий удвоенных гаплоидов, диплоидные растения размножили самоопылением.

Результаты исследования показывают, что частота эмбриогенеза и частота прямого прорастания зависят от генотипа растения-донора микроспор.

Зависимости частоты прямого прорастания от частоты эмбриогенеза не выявлено. Самую высокую частоту регенерации (89,8) наблюдали у генотипа, с самой низкой частотой эмбриогенеза (393 эмб/100бут.). У генотипа с самой высокой частотой эмбриогенеза частота прямого прорастания эмбриоидов на 8,5% была ниже, чем у генотипа с самой высокой частотой прямого прорастания эмбриоидов.

Благодарность: Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, в рамках соглашения № 075-15-2022-745 от 13.05.2022 года заключенного по гранту МК-3440.2022.5.

Библиографический список

1. *Chuong P.V.* Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus* / P.V. Chuong, C. Deslauriers, L.S. Kott, W.D. Beversdorf // *Can. J. Bot.* – 1988. – Vol. 66. – P. 1653-1657.
2. *Corral-Martínez P.* Doubled haploid production in high-and low-response genotypes of rapeseed (*Brassica napus*) through isolated microspore culture/

P. Corral-Martínez, C. Camacho-Fernandez, R. Mir, J. M. Seguí'-Simarro // Doubled haploid technology. – Humana, New York, NY, 2021. – С. 129-144.

3. Zaki M. A. M., Dickinson H. G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus* // *Protoplasma*. – 1990. – Т. 156. – С. 149-162.

4. Вишнякова А. В. Факторы прямого прорастания микроспорогенных эмбриоидов *Brassica Napus L*/ А.В. Вишнякова, А. А. Александрова, С. Г. Монахос // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2023. – Т. 1. – №. 6. – С. 43-53.

УДК 631.527

СОЗДАНИЕ АЛЛОПЛАЗМИЧЕСКОЙ МС МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA L.*) СЛИЯНИЕМ ПРОТОПЛАСТОВ

Алжарамани Насим, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений - ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, naseemjihadja@gmail.com

Аннотация: Одним из основных методов в селекции моркови (*Daucus carota L.*), является создание F1-гибридов на основе ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности). Аллоплазмики образуются, когда цитоплазма одного вида заменяется цитоплазмой другого вида посредством обратного скрещивания или биологических методов, таких как соматическая гибридизация [4]. Путем замены цитоплазмы клеток моркови цитоплазмой клеток родственных видов с мужской стерильностью (*Сельдерей*, *Ариум graveolens*, *Фенхель Foeniculum vulgare*) и обеспечения возможности регенерации этой аллоплазматической клетки во взрослое растение, получают растение моркови, имеющее как ЦМС, так и желаемые коммерческие характеристики.

Ключевые слова: *Daucus carota*, слиянии протопластов, гибрид, ЦМС цитоплазматической мужской стерильности, самонесовместимость

Морковь *Daucus carota L.* входит в десятку самых экономически важных овощных культур во всем мире как по площади производства, так и по рыночной стоимости.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) у моркови принимает две основные формы: «brown anthers» и «petaloid». Признак растения цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) определяется митохондриальным геномом и связан с фенотипом стерильности пыльцы, который может подавляться или противодействовать ядерным генам, известным как гены-восстановители фертильности. [1]

ЦМС, вызванная мутациями в митохондриальном геноме, обнаруживается у высших растений и увеличивает гетерозис и улучшает