

УДК 635.132:631.527: 577.1

**МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ ПЕРЕХОДА МИКРОСПОР
BRASSICA OLERACEA L. С ГАМЕТОФИТНОГО
НА СПОРОФИТНЫЙ ПУТЬ РАЗВИТИЯ**

Байдина Анастасия Васильевна, ассистент кафедр ботаники,
селекции и семеноводства садовых растений, РГАУ-МСХА имени
К.А.Тимирязева, luna-mars@sibk.ru

Аннотация: Изучена возможность применения альтернативных видов иницирующего стресса для перехода с гаметофитного пути развития на спорофитный у капусты белокочанной (*B. oleracea* L.). Показана эффективность использования высокой pH среды в сочетании с тепловым шоком для индукции эмбриогенеза в культуре микроспор.

Ключевые слова: эмбриогенез, капуста белокочанная, иницирующий стресс.

При культивировании микроспор в условиях *in vitro* развитие микроспор может идти двумя путями: гаметофитным и спорофитным. При гаметофитном пути развитии из микроспоры формируется трехядерная пыльца и на этом развитие завершается, при спорофитном пути развития - микроспора переходит к симметричным делениям и формированию эмбриодов.

Для перехода к спорофитному пути развития необходим толчок - иницирующей стресс. Широко распространены такие стрессовые предобработки, как тепловой или **Холодовой** шок, углеводное или азотное голодание, которые применяют как по отдельности, так и совместно [1]. В культуре микроспор, в качестве иницирующего стресса, повсеместно используется тепловой шок. Температура теплового шока, как правило, соответствует сублетальным температурам и в зависимости от культуры варьирует от 31 до 37 °С в течение нескольких часов или дней. У белокочанной

капусты *B. oleracea* чаще всего используют температуру теплового шока 30-33 °С в течение 1-3 дней [2, 3,4]. Однако тепловой шок не достаточно эффективен на многих видах растений, в частности на капусте белокочанной, о чем свидетельствует низкая отзывчивость большинства генотипов.

В нашей работе использовали различные варианты углеводного голодания (высокий рН среды, различные источники углеводов) и их сочетание с тепловым шоком для индукции эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор.

Для изучения влияния уровня рН среды NLN-13 8,0, как инициирующего стресса, на эмбриогенез в культуре микроспор были взяты 15 генотипов *Brassica oleracea* L.: ПлгОКи1-13, Сю2х(Дт46хс110)1, Плг0Ки1-15, ПлгОКи1-18, Фрг47, См8Ки1*см8/2, ПлгО, ПлгОКи2-4, Гэс2рх15цка1-1)1, Гэс2р×15-5)3, Атп1х(С110Ки×Сю2)13, (ЦСа1-1×са1)1, Гэс2р×15-5)2, Атп1*(С110Ки×Сю2)14, Мф43×15)22.

Изучение влияния разных источников углеводов на эмбриогенез проводили на 5 генотипах капусты белокочанной: (Гэс2рх (С110Ки×Сю2)1)1, Аут3Ки(14)×Цв9)2, Фрг47, ПлгО, Плг0Ки1-15.

Было выбрано 3 варианта инициирующего стресса: 1) стандартный 32,5 °С в течение 48 ч.; 2) рН 8,0 и тепловой шок 32,5 °С в течение 48 ч.; 3) рН 8,0 в течение 48 ч. при температуре 25 °С.

Для изучения влияния альтернативных источников углеводов были использованы 6 вариантов питательной среды: 1) стандартный NLN-13 с 130 г/л сахарозы, рН 5,8; 2) NLN-13 с 130 г/л мальтозы, рН 5,8; 3) NLN-13 с 130 г/л маннозы, рН 5,8; 4) NLN-13 с 130 г/л глюкозы, рН 5,8; 5) NLN-13 с 130 г/л фруктозы, рН 5,8; 6) NLN-13 с 130 г/л галактозы, рН 5,8.

Все эксперименты заложены в 3-4 кратной повторности в чашках Петри диаметром 6 см.

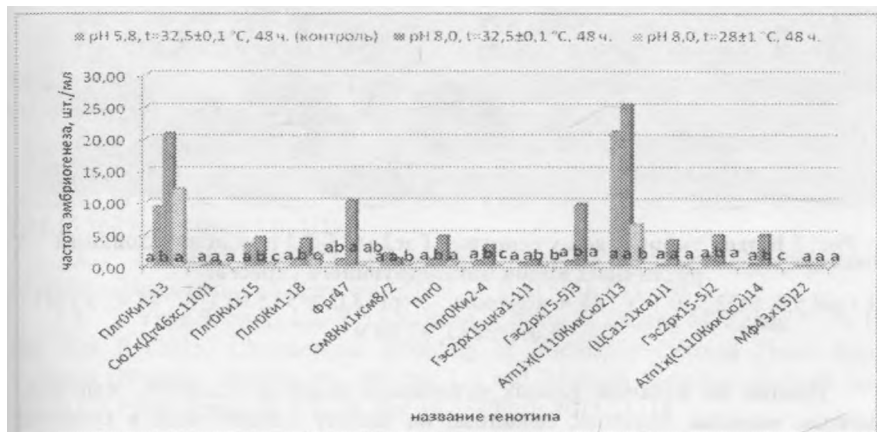


Рис. 1 Влияние углеводного голодания, вызванного высоким уровнем рН и теплового шока на частоту эмбриогенеза в культуре микроспор, эмбр./мл

Столбцы, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, б, в), согласно t-критерию Стьюдента не имеют существенного различия на 5 уровне значимости ($P < 0.05$).

На рис.1 представлены данные эксперимента по изучению культивирования микроспор на NLN-13 pH 8,0 в течение 48 ч., в качестве иницирующего стресса, и сочетания культивирования на NLN-13 pH 8,0 со стандартным тепловым шоком $t=32,5\pm 0,1$ °C, 48 ч. в течение 48 ч.

Показано, что культивирование на NLN-13 pH 8,0 позволяет получить эмбриониды у капусты белокочанной (рис.1), однако эффективность этого иницирующего стресса по сравнению со стандартным тепловым шоком не высока. У генотипов Плг0Ки1-15, Плг0Ки1-18, См8Ки1 × см8/2, ПлгОКи2-4. Гэс2рх15цка1-1)1, Атп1х(С110Ки×Сю2)13, (Атп1*(С110Ки×Сю2)14 наблюдали значимое уменьшение частоты эмбриогенеза по сравнению с тепловым шоком $t=32,5\pm 0,1$ °C в течение 48 ч.

Культивирование на NLN-13 pH 8,0 при $t=32,5\pm 0,1$ °C в течение 48 ч значимо увеличивает частоту эмбриогенеза у 8 (ПлгОКи1-13, Плг0Ки1-15. ПлгОКи1-18, ПлгО, ПлгОКи2-4, Гэс2р×15-5)3, Гэс2р×15-5)2, Атп1×(С110Ки×Сю2)14) из 15 испытанных генотипов, у остальных 7 генотипов частота эмбрионов остается на уровне контрольного варианта pH 5,8, $t=32,5\pm 0,1$ °C, 48 ч. На рис.2 показан выход эмбрионидов у генотипа Гэс2р×15-5)3 при различном типе иницирующего стресса, видно, что качество полученных эмбрионидов в контрольном варианте и при иницирующем стрессе pH 8,0. $t=32,5\pm 0,1$ °C в течение 48 ч. не различаются.

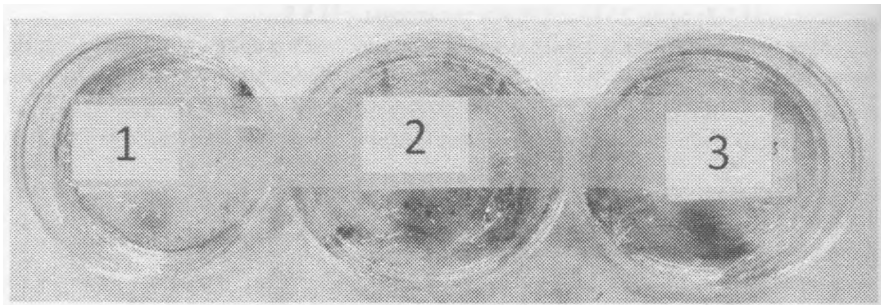


Рис. 2 Выход эмбрионидов у генотипа Гэс2рх 15-5)3 при использовании различных видов иницирующего стресса:

1 - pH 5,8, $t=32,5\pm 0,1$ °C, 48 ч. контроль; 2 - pH 8,0, $t=32,5\pm 0,1$ °C, 48 ч.; 3 - pH 8,0, $t=28\pm 1$ °C, 48 ч.

Данные по влиянию разных источников углевода (сахароза, мальтоза, глюкоза, манноза, фруктоза, галактоза) на частоту эмбриогенеза в культуре микроспор представлены в таблице.

Значимые изменения частоты эмбриогенеза при культивировании на средах с различными типами сахаров наблюдали у генотипов (Гэс2р×(С110Ки×Сю2)1)1 и Фрг47. Большую частоту эмбриогенеза наблюдали при культивировании генотипов на среде NLN-13, содержащую сахарозу в концентрации 130 г/л. На среде NLN-13 содержащей мальтозу в концентрации 130 г/л, были получены эмбриониды у генотипов (Гэс2р×(С110Ки×Сю2)1)1, Фрг47, ПлгО. У генотипов Аут3Ки(14)×Цв9)2 и Плг0Ки1-15 эмбриониды были получены только в контрольном варианте, содержащим сахарозу в концентрации 130 г/л. На средах, в которых в качестве источника углерода использовали моносахариды: маннозу, галактозу, фруктозу и глюкозу в концентрации 130 г/л эмбриониды получены не были ни у одного генотипа, что говорит о негативном влиянии простых сахаров на переход микроспор к спорофитному пути развития.

Таблица

Генотип	Влияние ди- и моносахаридов на частоту эмбриогенеза, эмбрионидов/чащку					
	Варианты жспешмента					
	Сахароза 130г/л	Мальтоза 130г/л	Машноза 130г/л	Г алактоза 130г/л	Фруктоза 130г/л	Глюкоза 130г/л
(Гэс2р× (С110Ки×Сю2)1)1	19,33±4,71a	5,00±1,13Б	0,00с	0,00с	0,00с	0,00с
Аут3Ки(14)×Цв9)2	1,00±1,13a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Фрг47	17,67±4,71a	4,33±3,46Б	0,00Б	0,00Б	0,00b	0,00Б
Плг0-1	1,67±1,73a	0,33±0,65a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Плг0Ки1-15	6,00±4,	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Примечание: значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, Б, с), согласно t-критерию Стьюдента не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости (P < 0.05).

Библиографический список

1. Shariatpanahi M.E., Bal U., HeberleHBors E., Touraev A. (2006) Stresses applied for the re I programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol Plant* 127: 519П534
2. Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.M., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pI, MES, arabinogalactan-pro- teins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2012; 1 10:69-76. D01:10.1007/s 11240-012-0131-z
3. Cristea, T. O. (2013). The influence of pH on microspore embryogenesis of white cabbage (*Brassica oleracea*L.). *Not Sci Biol.*5(4): 485—489.
4. Yuan S, Su Y, Liu Y, Li Z, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H and Sun P (2015) Chromosome Doubling of Microspore-Derived Plants from Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Front. Plant Sci.* 6:1118. doi: 10.3389/fpls.2015.01118