

На правах рукописи

МАЙ ДЫК ЧУНГ

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА (*BRASSICA
NAPUS* L.) И БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ (*BRASSICA OLERACEA* L.)
*IN VITRO***

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Российском государственном аграрном университете-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

**Калашникова
Елена Анатольевна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

**Поляков
Алексей Васильевич**

кандидат биологических наук

**Ралдугина
Галина Николаевна**

Ведущая организация: Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Защита состоится 23 декабря 2010 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.10 при Российском государственном аграрном университете-МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.49. Факс (499) 976-24-92.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан 22 ноября 2010 г. и размещен на сайте университета www.timacad.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета

Л.С. Большакова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важным направлением в современной селекции является создание улучшенных и принципиально новых генотипов сельскохозяйственных 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.

Метод культуры изолированных пыльников и микроспор (андрогенез) – один из перспективных способов получения гаплоидных растений. Подбор оптимальных условий культивирования, обеспечивающих дифференцировку эмбрионов из репродуктивных органов (микроспоры и семязачки) и сравнение этого процесса с процессом формирования соматических и зиготических зародышей является предметом биохимических и морфологических исследований, и целью опытов по изучению молекулярных механизмов, специфичных для эмбриогенеза. Андрогенез зависит от ряда взаимосвязанных факторов (генетических, физиологических, факторов внешней среды (минерального и гормонального состава питательной среды), условий культивирования), каждый из которых оказывает свое влияние на морфогенетические процессы при культивировании изолированных пыльников и микроспор *in vitro*. Результаты исследований ряда авторов показали, что до сих пор эмбриогенез в культуре пыльников *in vitro* различных видов *Brassica* происходит спонтанно и имеет низкую частоту выхода гаплоидных растений (1-4%), более того предлагаемые технологии трудно воспроизводимы и недостаточно изучены на каждом этапе андрогенеза. Помимо этого технология получения растений-регенерантов различных видов *Brassica* из изолированных семязачек (процесс гиногенеза) из известной литературы не отработана. Поэтому данное направление исследований является актуальным.

Цель и задачи исследований. Цель исследований - разработка регламента получения растений-регенерантов рапса (*B. napus* L.) и белокочанной капусты (*B. oleracea* L.) из репродуктивных органов путем прямого эмбриогенеза; совершенствование технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений.

Задачи исследований:

- Выявить оптимальность стадии развития микроспор в пыльниках в зависимости от расположения бутонов в соцветии и изучить первые этапы развития микроспор внутри пыльника в условиях *in vitro*;
- Исследовать влияние предобработки соцветий и установить

- оптимальные режимы воздействия на процесс прямого эмбриогенеза;
- Изучить влияние различных питательных сред на морфогенез репродуктивных органов различных видов *Brassica*;
 - Изучить процесс формирования первичных и вторичных эмбриоидов, а также адвентивных почек при размножении в культуре *in vitro* различных видов *Brassica*;
 - Усовершенствовать методики адаптации растений-регенерантов к почвенным условиям и методики получения дигаплоидных растений;
 - Провести цитологические исследования гаплоидных и дигаплоидных растений;
 - Усовершенствовать экспресс-метод по идентификации последовательности гомологичных генов, отвечающих за устойчивость растений рапса к вирусу желтухи репы (*Turnip yellow virus* - TuYV).

Научная новизна. Совершенствована технология получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса и белокочанной капусты путем прямого эмбриогенеза из микроспор изолированных пыльников.

Впервые для белокочанной капусты оптимизирован первый этап получения растений-регенерантов из семяпочек изолированных завязей. Установлена оптимальная стадия развития микроспор в пыльниках в зависимости от расположения бутонов в соцветии и изучены этапы развития микроспор внутри пыльника в условиях *in vitro*. Предложена схема комплексной предобработки соцветий пониженными (+4-6⁰С в течение 2-х суток) и повышенными (+32⁰С в течение 1-х суток) температурами в сочетании с обработкой соцветий нитратом серебра (40 мг/л), обеспечивающая индукцию прямого эмбриогенеза.

Установлены оптимальные составы питательных сред для индукции прямого эмбриогенеза в культуре изолированных пыльников: для рапса - минеральные соли по прописи В₅, кинетин 1 мг/л, НУК 0,5 мг/л; для белокочанной капусты - минеральные соли по прописи В₅, Дропп 0,2 мг/л, НУК 0,05 мг/л; для изолированных семяпочек белокочанной капусты – минеральные соли по прописи В₅, Дропп 1,0 мг/л, ИУК 0,5 мг/л.

Изучен процесс первичного эмбриогенеза из изолированных микроспор и вторичного эмбриогенеза из изолированных сегментов гипокотыля и семядолей гаплоидных растений рапса.

С использованием экспресс-метода (ПЦР-анализ) по идентификации фрагментов генов, отвечающих за устойчивость растений рапса к вирусу желтухи репы (*Turnip yellow virus* - TuYV), выявлены три линии, которые можно рекомендовать для включения в селекционный процесс при подборе родительских пар с целью создания сортов, устойчивых к данному вирусу.

Практическая значимость работы. Полученные гаплоидные и дигаплоидные растения рапса переданы на Селекционную станцию

им. Н.Н. Тимофеева РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Разработанная методика создания дигамплоидных растений рапса и гамплоидных растений белокочанной капусты может быть применена и к другим представителям рода *Brassica*. Полученные результаты используются в учебном процессе при чтении лекций и проведения лабораторно-практических работ по курсу «Сельскохозяйственная биотехнология» и «Основы биотехнологии».

Апробация работы. Результаты работы представлены на: Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2008), Международной конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биотехнологии» (Брянск, 2008), Международной научно-практической конференции РГАУ-МСХА (Москва, 2009), Международном симпозиуме по фенольным соединениям «Фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2009), 5-й Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы нанобиотехнологии и инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе-партнеринге по биотехнологии и биоэнергетике (Москва, 2010), 10-й молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2010), 3-й Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (Волгоград, 2010), Международной научной конференции молодых ученых и специалистов РГАУ-МСХА (Москва, 2010), 5-ом Всероссийском смотре научных и творческих работ иностранных студентов и аспирантов вузов (Томск, 2010), Международной конференции «Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур» (Казахстан, Алматы, 2010).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1) Усовершенствованный метод культуры микроспор из изолированных пыльников рапса (*B. napus* L.) и белокочанной капусты (*B. oleracea* L.), а также семяпочек из изолированных завязей белокочанной капусты, включающий:

- оптимальность стадии развития микроспор в пыльниках от расположения бутонов в соцветии;
- совместное применение обработки соцветий пониженными и повышенными температурными режимами в сочетании с нитратом серебра;
- модифицированную питательную среду для культивирования пыльников и семяпочек в условиях *in vitro*;
- адаптацию растений-регенерантов к почвенным условиям и получение дигамплоидных растений.

2) Процесс индукции прямого эмбриогенеза из изолированных микроспор и образование вторичных эмбриоидов и адвентивных почек из изолированных сегментов гипокотыля, семядолей гаплоидных растений.

3) Молекулярно-генетические исследования растений рапса.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, из которых 2-статьи в журналах, включенных в перечень журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, выводов, предложений для использования в селекционной практике, списка использованной литературы. Объем работы составляет страниц. В диссертации содержится ... рисунков, ... таблиц. Список использованной литературы содержит ... источников, в том числе ... на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу проводили на сортах и гибридах F₁ представителей рода *Brassica*: белокочанной капусте (*B. oleracea* L.): гибрид F₁ Юбилей, сорт Клаус, линии ЭТ1 и АМФ 3Л; и рапсе (*B. napus* L.): гибрид WF×Титан. Растения – доноры выращивали в теплице на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в течение года. Объектом исследования служили изолированные бутоны, микроспоры, завязи и семяпочки.

В работе использовали питательные среды по прописи Мурасиге и Скуга (МС), Гамборга (B₅), Нича (N₆) с добавлением фитогормонов. В качестве веществ с цитокининовой активностью использовали Дропп, БАП, кинетин, 2iP (2-изопентениладенин) в концентрациях 0,2 - 2,0 мг/л, в качестве веществ ауксинового типа – 2,4-Д, НУК, ИУК в концентрациях 0,5 – 1,5 мг/л. рН среды находился в пределах 5,5-5,8.

Исследования проводили на бутонах из соцветий, которые изолировали как с главного, так и боковых побегов. Схема включала 6 вариантов:

1) обработка соцветий низкой положительной температурой (+4-6⁰С) в течение 2 суток до введения пыльников в культуру *in vitro*;

2) обработка пыльников высокой температурой (+32⁰С) в течение 1 суток после введения их в культуру *in vitro*;

3) сочетание низкой положительной температуры (+4-6⁰С) в течение 2 суток (до введения в культуру *in vitro*) с последующей обработкой высокой температурой (+32⁰С) в течение 1 суток после введения пыльников в культуру *in vitro*;

4) обработка соцветий раствором нитрата серебра 40 мг/л в течение 2 суток при температуре 25⁰С;

5) обработка соцветий раствором нитрата серебра 40 мг/л в течение 2 суток при температуре +4-6⁰С.

6) обработка соцветий раствором нитрата серебра 40 мг/л в течение 2 суток при температуре +4-6⁰С с последующим культивированием изолированных пыльников *in vitro* при температуре +32⁰С в течение 1 суток.

Для получения фертильных соцветий растения-регенеранты рапса были обработаны в течение 7 дней 0,5%-ным колхицином в сочетании с 4%-ным раствором диметилсульфоксида (ДМСО). Обработку проводили путем нанесения раствора на пазушные почки растений, после чего растительный материал переносили в условия холодной обработки (+4⁰С) на 30 суток. По истечении срока стратификации растения пересаживали в теплицу.

Цитологический анализ растений-регенерантов проводили путем подсчета хромосом в корневых меристемах, а также количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (Практикум по цитологии и цитогенетике растений, 2007).

Выделение тотальной растительной ДНК проводили с использованием методики, предложенной Edwards et al. (1991). В работе использовали праймеры «344» (forward: 5'-GATCCGTTTGGGTCTTGGTA-3'; reverse: 5'-TTGATGTGAAACGCACATTG-3') и «437» (forward 5'-ATCGGACATTGGTCAGGTTTC-3'; reverse 5'-CATACCCCACTGGTTCTTGG-3'), синтезированные в ЗАО «Синтол» (Москва). Амплификацию проводили на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология», Москва), используя следующий температурный профиль : 94⁰С - 4 мин; 35 циклов: 94⁰С - 1 мин, 54⁰С - 1 мин, 72⁰С - 1 мин и 20 сек., 72⁰С - 4 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия в ТВЕ буфере при 120В в течение 40 минут. Электрофореграммы визуализировали с помощью гельдокументирующей видеосистемы. Длину фрагментов определяли с использованием маркера молекулярной массы 100-3000 бр.

Математическая обработка экспериментальных данных выполнена на основе методов математической статистики (Лакин Г.Ф., 1980; Смиряев А.В., Кильчевский А.В., 2007). Дисперсионный анализ проводили на ПЭВМ с использованием пакета программы *MS EXCEL*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Совершенствование технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса (*Brassica napus* L.) *in vitro*

Исходя из литературных данных, для различных видов растений, и, в частности, для рапса изучена зависимость стадии развития микроспор от

размера бутона в момент инокуляции. Однако данный подход имеет место только в том случае, когда изолирование бутонов осуществляется с главного соцветия, находящегося в определенной фазе цветения (начало бутонизации). Кроме того, зависимость стадии развития микроспор от размера бутона зависит от сортовых особенностей изучаемой культуры, что затрудняет технологический процесс массового получения гаплоидных растений, так как связано с ограничением временного интервала изолирования первичного экспланта. С целью разработки более эффективных приемов андрогенеза целесообразно увеличить сроки введения изолированных эксплантов в культуру *in vitro* за счет включения в работу соцветий не только главного, но и боковых побегов.

В связи с этим был проведен цитологический анализ по определению процентного содержания одноядерных микроспор в бутонах, расположенных в разных рядах от центра главного и боковых соцветий (Табл. 1).

Таблица 1. Содержание микроспор, находящихся на разных стадиях развития в пыльнике в зависимости от места расположения бутона в главном и боковых соцветиях рапса (гибрид WF×Титан), %

Место расположения бутона от центра соцветия, ряд	Стадии развития микроспор		
	1 - 2	3 - 6	7 - 9
центр соцветия	82,3 (75,7÷88,0) *	3,1 (1,0÷6,5)	0
1-2 ряд	22,4 (15,7÷29,1)	75,1 (68,2÷82,0)	0
3-4 ряд	10,1 (5,9÷15,4)	87,5 (81,7÷92,3)	0
5-6 ряд	0	10,4 (6,1÷15,8)	80,7 (74,0÷86,6)
> 6 ряд	0	0	98,8 (96,4÷99,9)

* - здесь и далее 95 %-ный доверительный интервал

Как следует из таблицы 1 микроспоры, находящиеся на одноядерной стадии развития, находятся, как правило, в бутонах, расположенных как на главном, так и на боковых соцветиях в рядах от 1 до 4 от его центра. Содержание микроспор в пыльниках в стадии ранней средней одноядерной (3 стадия) до поздней одноядерной (6 стадия) составляет 75,1 – 87,5%. Кроме того, при изолировании бутонов целесообразно учитывать цвет пыльника, который должен иметь окраску светло-зеленого цвета.

В многочисленных исследованиях выявлен ряд факторов, от которых зависит процесс андрогенеза в культуре *in vitro*, способствующих увеличению доли морфогенных микроспор (Рахимбаев И.Р. и др., 1992, Тюкавин Г.Б., 2007). К этим факторам относятся: макро- и микроэлементы, витамины, компоненты углеводного и азотного питания, регуляторы роста, агар.

В связи с этим целью наших экспериментов было определение оптимального минерального состава питательной среды, оказывающего индуцирующее влияние на процесс формирования эмбриоидов *in vitro* из изолированных пыльников и микроспор растений рапса. В работе изучали влияние минеральных солей по прописи МС, В₅ и N₆ (Рис. 1). В качестве регуляторов роста в состав питательной среды входили НУК и кинетин в концентрациях 1 мг/л, а также сахароза и агар в концентрации 3% и 0,8%, соответственно.

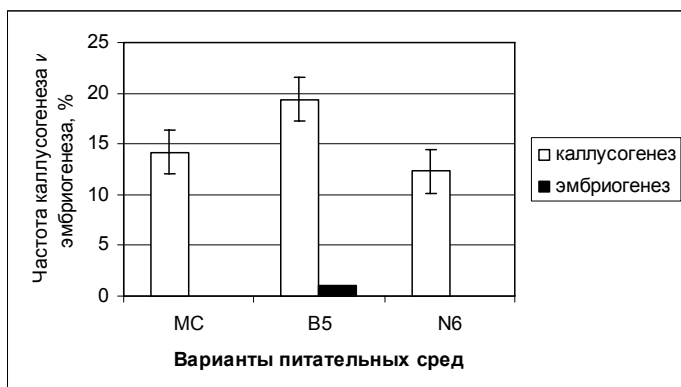


Рис. 1. Зависимость каллусо- и эмбриогенеза пыльников гибрида WFxТитан от минерального состава питательных сред

В результате исследований установлено, что оптимальной средой для культивирования пыльников была среда, содержащая минеральные соли по прописи Гамборга. В этих условиях микроспоры внутри пыльника сохраняли свою жизнеспособность на протяжении длительного периода выращивания в условиях *in vitro*, и нами был отмечен процесс прямого эмбриогенеза.

Для понимания закономерностей андрогенеза *in vitro* важно изучить пути развития микроспор, формирование морфогенных структур и регенерацию растений. Поэтому при культивировании пыльников необходимо учитывать особенности всех тканей, так как наряду с микроспорами в образовании эмбриоидов могут принимать участие и соматические клетки пыльников.

Цитологические исследования показали, что в процессе культивирования пыльников рапса в течение 25 дней на среде В₅, содержащей кинетин 1 мг/л и НУК 1 мг/л, наблюдали процесс образования из микроспор сильно вакуолизированных и активно делящихся клеток. В дальнейшем они подвергались многократным симметричным митотическим делениям, что вело к формированию сначала двухклеточных микроспор, а затем многоклеточных структур (Рис. 2 а). Развитие этих структур происходило двумя путями: 1) формирование эмбриоидов, 2) формирование вытянутых клеток и дальнейшая их гибель. Визуально было отмечено, что формирование эмбриоидов происходило лишь в том случае, когда структуры попадали на питательную среду после разрыва оболочки пыльника (Рис. 2 б). В случае,

если структуры оставались внутри пыльника, то наблюдали процесс формирования вытянутых клеток, похожий на процесс прорастания пыльцы *in vivo* (Рис. 2 в,г). Эта способность была характерна только для клеток, которые находились в периферийной зоне клеточных структур. Такие структуры в дальнейшем не были способны к эмбриогенезу и погибали в процессе культивирования. Таким образом можно предположить, что низкая частота эмбриогенеза в культуре изолированных пыльников связана с незначительным выходом клеточных структур на питательную среду.

При невысокой частоте эмбриогенеза, равной 1%, общее среднее число индуцированных эмбриоидов на один пыльник составило 16 - 25 шт., причем данный процесс происходил асинхронно (Рис. 3).

В случае культивирования пыльников на средах МС и N₆ деление микроспор не было отмечено, наблюдали лишь формирование каллусной ткани из тычиночной нити пыльника, которая не представляла интерес для дальнейших исследований.

Одним из факторов, индуцирующих процесс андрогенеза, являются различные способы предобработки бутонов или соцветий, которые могут переключать развитие микроспор с гаметофитного на спорофитный путь.

В наших исследованиях использовали 6 вариантов обработки эксплантов (см. материалы и методы исследований), из которых наиболее оптимальной была следующая схема: обработка соцветий раствором нитрата серебра в концентрации 40 мг/л в течение 2 суток при температуре +4-6⁰С с последующим культивированием изолированных пыльников *in vitro* при температуре +32⁰С в течение 1 суток (Табл. 2).

Таблица 2. Влияние различных способов предобработки эксплантов на процесс андрогенеза

Вариант обработки	Количество пыльников		
	культивируемых, шт.	образующих каллусную ткань, %	образующих эмбриониды, %
1	365	9,6 (6,8÷12,8)	0,82 (0,16÷2)
2	326	12,9 (9,5÷16,8)	1,5 (0,47÷3,1)
3	386	2,59 (1,2÷4,4)	1,0 (0,25÷2,3)
4	350	13,7 (10,3÷17,5)	1,4 (0,43÷2,9)
5	345	7,3 (4,8÷10,3)	1,5 (0,5÷3,1)
6	337	14,0 (10,5÷17,9)	2,1 (0,84÷3,9)
7 контроль (без предобработки)	380	9,2 (6,5÷12,3)	1,1 (0,3÷2,4)

Как следует из таблицы 2, в варианте № 6 частота андрогенеза составила 2,1%, что примерно в 2 раза выше по сравнению с контрольным вариантом (без обработки). Повышенная морфогенетическая активность изолированных пыльников и микроспор связана, вероятно, с применением ступенчатой предобработки эксплантов различными температурами, а также нитратом серебра. Разработанный нами методический подход был применен в дальнейших экспериментах.

При культивировании эксплантов, обладающих низким морфогенетическим потенциалом, актуальным остается поиск эффективных регуляторов роста, повышающих их морфогенную активность. В работе было изучено 30 вариантов питательных сред, отличающихся разными комбинациями цитокининов (БАП, кинетин, 2iP) и ауксинов (ИУК, 2,4-Д, НУК) (Табл. 3).

Таблица 3. Эффективность каллусо- и морфогенеза рапса на питательной среде В₅ с различным сочетанием регуляторов роста, %

			Цитокинины, мг/л								
			БАП			Кинетин			2 iP		
			2	1	0,5	2	1	0,5	2	1	0,5
Ауксины, мг/л	НУК	1	K* (70,0) 65,3÷74,8			K* (85,7) 81,8÷89,1	K* (30,8) 26,0÷35,6 Э* (1,1) 0,26÷2,5		K* (59,6) 54,2÷65,0	K* (35,0) 30,1÷39,9 Э* (0,7) 0,11÷1,8	
		0,5		K* (45,4) 40,5÷50,3			K* (15,5) 12,0÷19,4 Э* (2,4) 1,0÷4,3	K* (8,6) 5,8÷12,0 Э* (0,6) 0,07÷1,6			K* (28,0) 23,5÷32,5 Э* (0,6) 0,07÷1,6
	2,4-Д	1	K* (85,6) 81,8÷89	K* (74,2) 69,7÷78,7		K* (83,9) 79,7÷97,7	K* (71,0) 66,3÷75,7		K* (92,2) 89,0÷94,9	K* (65,4) 60,5÷70,4	
		0,5		K* (25,4) 20,6÷30,2	K* (20,7) 16,2÷25,2		K* (42,4) 37,2÷47,6	K* (36,7) 31,7÷41,7		K* (72,4) 67,4÷77,4	K* (64,1) 59,1÷69,1
	ИУК	1	K* (52,7) 47,7÷57,7			K* (47,0) 41,7÷52,3			K* (42,3) 37,2÷47,4		
		0,5		K* (24,0) 19,8÷28,2 Э* (1,2) 0,31÷2,6	K* (12,7) 9,4÷16,5 Э* (0,2) 0÷0,96		K* (32,2) 27,5÷36,9 Э* (0,54) 0,04÷1,6	K* (9,8) 7,0÷13,0 Э* (0,6) 0,07÷1,6		K* (21,4) 17,1÷25,7 Э* (0,25) 0÷1,0	K* (26,0) 21,3÷30,7 Э* (1,4) 0,41÷3

*K** - каллусогенез; *Э** - эмбриогенез

Исследования показали, что оптимальной средой для индукции прямого эмбриогенеза была среда, содержащая кинетин 1 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л. В этом варианте частота андрогенеза составила 2,4% со средним числом 11 шт. эмбриоидов на один пыльник.

В дальнейшем сформированные эмбриоиды отделяли от первичного экспланта и переносили на среды, содержащие минеральные соли по прописи МС, а также разные гормоны и концентрации агара: 1) твердая безгормональная среда МС, сахароза – 2 %, агар - 8 г/л; 2) жидкая

безгормональная среда МС (с применением фильтровальной бумаги (на мостиках)), сахара – 2 %, 3) твердая среда МС, сахара – 2 %, агар - 8 г/л, ИУК – 0,5 мг/л, БАП – 0,5 мг/л.

Было установлено, 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. При длительном культивировании растений в условиях жидкой среды наблюдали спонтанное образование вторичных эмбриоидов, которые формировались из эпидермальных клеточных слоев гипокотилия и семядолей (Рис. 4).

Сформированные вторичные эмбриоиды 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 на разные питательные среды для размножения. Для этого применяли два способа: 1 – индукция развития существующих в растении меристем (пазушные и апикальные почки), 2 – индукция образования адвентивных почек или эмбриоидов непосредственно тканями экспланта (сегменты семядольных листьев, гипокотиль). В качестве индукторов морфогенеза в питательную среду добавляли вещества из группы цитокининов 2ip и БАП в концентрациях 0,5 - 1,5 мг/л, и из группы ауксинов – ИУК - 0,5 мг/л (Табл. 4).

Таблица 4. Частота образования эмбриоидов у изолированных гипокотильных сегментов и сегментов семядольных листьев, %

Экспланты Среды	Изолированные гипокотильные сегменты	Изолированные сегменты семядольных листьев
	частота образования эмбриоидов, %	частота образования эмбриоидов, %
Среда МС(0,5 мг/л кинетин)	36,4 (9,9÷23,8)	41,6 (14,8÷28,4)
Среда МС (1 мг/л кинетин)	50,0 (13,4÷26,5)	27,3 (10,5÷25,1)
Среда МС (0,5 мг/л 2ip)	71,4 (63,4÷79,4)	40,0 (20,9÷39,0)
Среда МС (1 мг/л 2ip)	60,0(43,4÷60,6)	56,2 (48,1÷64,3)

Как следует из таблицы 4, оптимальные условия для индукции вторичных эмбриоидов была среда, содержащая минеральные соли по прописи МС в сочетании с 2ip в концентрации 0,5-1,0 мг/л. В этом варианте частота эмбриогенеза для изолированных гипокотильных сегментов составила 71,4%, для сегментов семядольных листьев – 56,1%. Среднее число эмбриоидов на один эксплант составило от 7 до 31 шт. (Рис. 5).

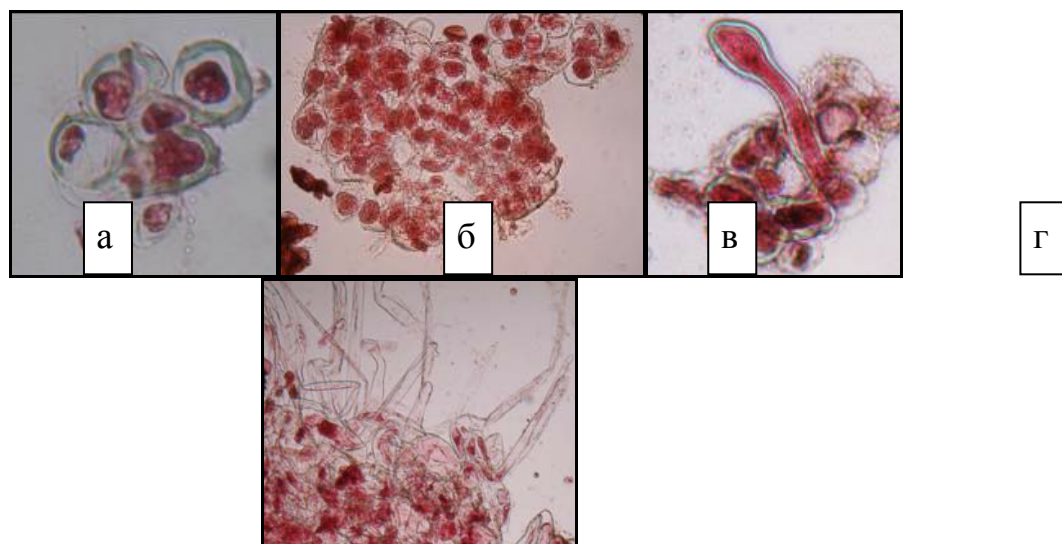


Рис. 2. Развитие микроспор и формирование клеточных структур:
а – многоклеточные структуры, **б –** формирование эмбрионов, **в, г –** формирование вытянутых клеток, похожих на прорастающую пыльцу *in vivo*

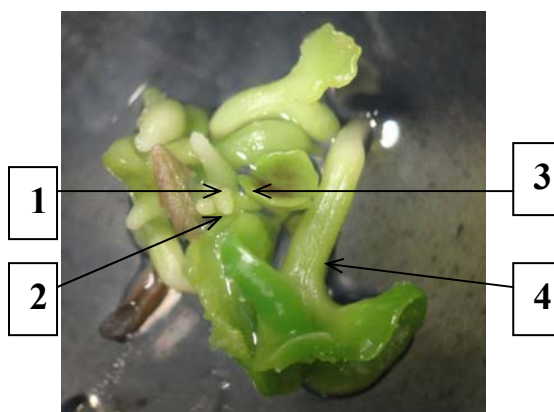


Рис. 3. Асинхронное формирование эмбрионов: 1 – глобулярная стадия, **2 –** сердцевидная стадия, **3 –** стадия торпеды, **4 –** проросток

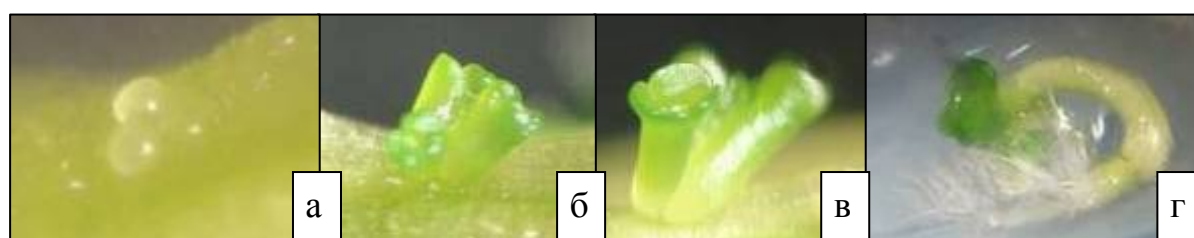


Рис. 4. Формирование и развитие вторичных соматических эмбрионов:
а - глобулярная стадия на 4 день наблюдений, **б –** сердцевидная стадия на 8 день наблюдений, **в –** торпедовидная стадия на 12 день наблюдений, **г –** формирование проростка на 19 день наблюдений

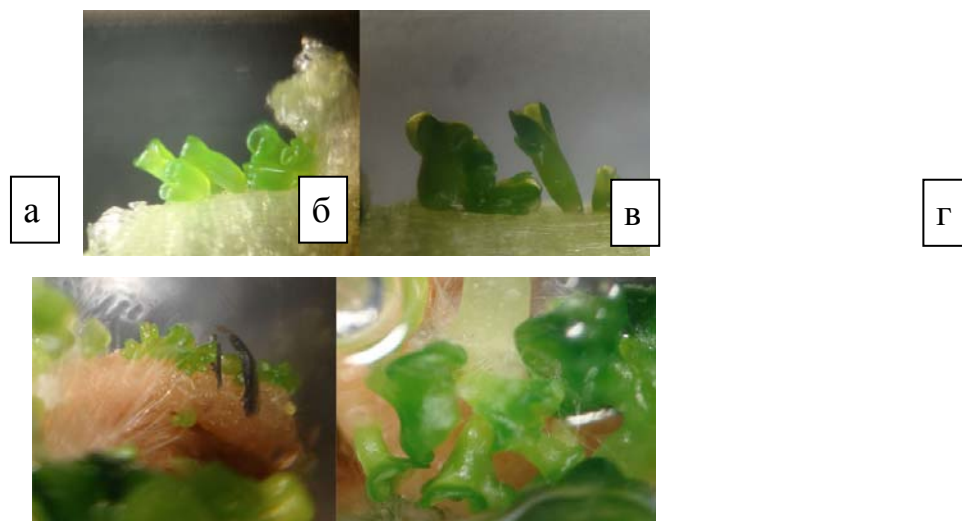


Рис. 5. Дифференцировка вторичных соматических эмбрионов: а, б – на изолированных сегментах гипокотыля, в, г – на изолированных сегментах семядольных листьев

Для доказательства гаплоидной природы полученных растений-регенерантов рапса применен метод подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и числа хромосом в меристеме корня.. Установлено, что количество хлоропластов у 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). Уменьшенное количество хлоропластов было также в растениях, полученных из вторичных эмбрионов. Нами установлено, что у растений-регенерантов содержится одинарный набор хромосом (Рис. 6 в).

Полученные гаплоидные растения рапса были обработаны раствором колхицина, что привело в 50% случаев к формированию фертильных цветков с последующим созреванием семян, в то время как в варианте без обработки колхицином растения были стерильными, и семена не образовывались. Полученные семена были высеяны в почву, из них формировались дигаплоидные растения.

Данная технология отличается от существующих: 1) регламентом предобработки эксплантов; 2) рекомендациями по изолированию бутонов в соответствии с их месторасположением в соцветии; 3) питательными средами, обеспечивающими индукцию образования первичных и вторичных эмбрионов; 4) технологией адаптации растений-регенерантов к почвенным условиям; 5) технологией получения дигаплоидных растений.

Предложения для использования в селекционной практике

Для получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса в культуре изолированных пыльников и микроспор необходимо:

- проводить предобработку эксплантов по следующей схеме: обработка соцветий раствором нитрата серебра в концентрации 40 мг/л в течение 2 суток при температуре +4-6⁰С;

- отобрать бутоны, расположенные в средних рядах соцветия (1-4 ряд), учитывая при этом цвет пыльника, который должен иметь светло-зеленую окраску;

- культивировать изолированные пыльники *in vitro* на среде, содержащей минеральные соли по прописи В₅, содержащей кинетин 1 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л при температуре +32⁰С в течение 1 суток, с последующим переносом эксплантов в стандартные условия культивирования (16-часовой фотопериод, температура 25⁰С, интенсивность освещения 5 тыс. лк);

- для увеличения коэффициента размножения применять питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, в сочетании с 2ip в концентрации 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, сахара 2%;

- для доказательства гаплоидности полученных растений провести цитологический анализ количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и числа хромосом в клетках меристемы корня;

- адаптацию растений-регенерантов проводить в субстрате торф: дерновая земля в соотношении 1:1 в течение 14 суток;

- для получения дигаплоидных растений провести обработку растений в течение 7 суток 0,5%-ным колхицином в сочетании с 4%-ным раствором диметилсульфоксида путем нанесения раствора на пазушные и верхушечные почки.

Технология получения гаплоидных растений белокочанной капусты (*Brassica oleraceae* L.) *in vitro*

Разработанная нами технология получения гаплоидных растений рапса была апробирована на белокочанной капусте. В результате исследований выявлены некоторые особенности технологического процесса андрогенеза. Экспериментально установлено, что микроспоры, находящиеся на одноядерной стадии развития, находятся, как правило, в бутонах, расположенных как на главном, так и на боковых соцветиях на расстоянии 0,5 - 2 см от его верхушки (Табл. 5).

Таблица 5. Развитие микроспор в зависимости от места расположения бутона в главном и боковых соцветиях белокочанной капусты, %

Место расположения бутона в соцветии, см	Стадии развития микроспор		
	1 - 2	3-6	7-9
0-0,2	85,1 (78,0÷91,0)	10,5 (5,5÷16,6)	0
0,2-0,5	65,8 (56,9÷74,6)	31,2 (23,9÷38,5)	0
0,5-1	25,8 (17,7÷33,9)	66,5 (58,1÷74,9)	0
1-1,5	10,5 (5,8÷16,4)	86,5 (80,6÷91,5)	5,6 (2,4÷10,1)

1,5-2	0	60,7 (51,6÷69,8)	30,1 (21,7÷38,5)
2-2,5	0	20,2 (12,6÷27,8)	65,7 (57,0÷74,4)
2,5-3	0	8,7 (4,1÷14,8)	85,6 (79,4÷90,8)
>3	0	0	95,6 (91,0÷98,6)

В этом положении содержание микроспор в пыльниках в стадии ранней средней одноядерной (3 стадия) до поздней одноядерной (6 стадия) составляет 60,7 – 86,5 %. В остальных бутонах, расположенных либо выше, либо ниже указанного расстояния, микроспоры в основном находились в стадии тетрад или зрелой пыльцы.

В следующей серии экспериментов была апробирована разработанная нами ранее для рапса методика по предобработке соцветий. Изолированные пыльники культивировали на среде В₅, содержащей кинетин в концентрации 1 мг/л и НУК 0,5 мг/л. В этих условиях наблюдали формирование лишь каллусной ткани (Рис. 7 а,б), из которой на среде, содержащей БАП и ИУК в концентрациях 1 мг/л и 0,5 мг/л, соответственно, формировались адвентивные побеги (Рис. 7 в). Частота морфогенеза составила в среднем 25,7%, а среднее число побегов на один каллус - от 2 до 4 шт.

Исходя из того, что при разработке гаплоидной технологии необходимо добиться прямой регенерации растений из культивируемых пыльников и микроспор были проведены исследования по подбору гормонального состава питательных сред (40 вариантов). Для этого были изучены разные комбинации цитокининов (БАП, кинетин, 2ip) и ауксинов (ИУК, НУК). Кроме того, изучали влияние на процесс андрогенеза мало применяемый для растений рода *Brassica* препарат Дропп.

Исследования показали, что присутствие в питательной среде Дроппа в различных концентрациях (от 0,2 до 1,0 мг/л) в сочетании с НУК 0,05 мг/л стимулировало процесс прямого эмбриогенеза до 8,2% (Рис. 7 г).

Для разных генотипов белокочанной капусты было изучено влияние Дроппа (0,2 – 2,0 мг/л) на процессы прямого эмбриогенеза (Табл. 6). Установлена зависимость этого процесса от генотипических особенностей культивируемых пыльников. Повышенной морфогенетической активностью отличалась линия АМФ 3Л, для которой в вариантах с присутствием Дропп 0,2 мг/л учитываемый показатель составил 8,2%, в варианте с Дроппом 0,5 мг/л и 0,1 мг/л – 2,6% и 1,1%, соответственно. При более высоких концентрациях Дроппа в питательной среде процесс эмбриогенеза не был отмечен ни для одного из изучаемых генотипов. Вероятно, повышенные концентрации гормона в питательной среде приводят к изменению метаболических процессов, что вызывает гибель пыльника и микроспор.

Таблица 6. Влияние различных концентраций Дроппа в питательной среде на индукцию прямого эмбриогенеза изолированных пыльников (во всех вариантах содержание НУК 0,05 мг/л)

Генотипы	Концентрация Дроппа, мг/л				
	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0
Клаус	2,8 (1,3÷4,8)	0,6 (0,05÷1,7)	0	0	0
Эт1	2,3 (1,0÷4,1)	0,8 (0,12÷1,9)	0,5 (0,04÷1,5)	0	0
АМФ 3Л	8,2 (5,6÷11,3)	2,6 (1,2÷4,5)	1,1 (0,29÷2,4)	0	0
F ₁ Юбилей	3,2 (1,7÷5,3)	1,3 (0,42÷2,7)	0	0	0

Эмбриоиды, индуцированные на среде с препаратом Дропп, были перенесены на среды для размножения (минеральные соли по прописи МС, Дропп - 0,5 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л, сахара - 2%).

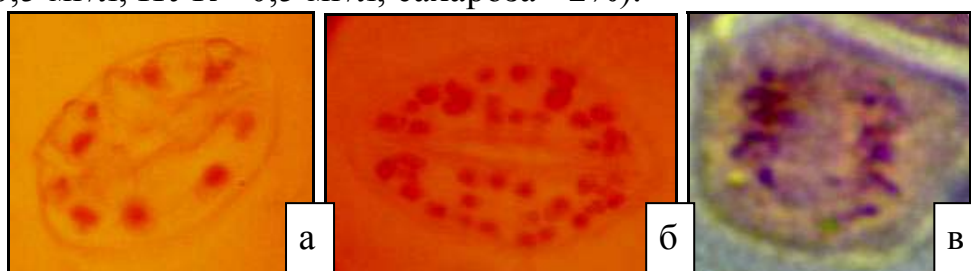


Рис. 6. Доказательство гаплоидной природы растений-регенерантов рапса: хлоропласты в замыкающих клетках устьиц (а – гаплоидные растения, б – диплоидные растения); в - одинарный набор хромосом в меристеме корня гаплоидных растений

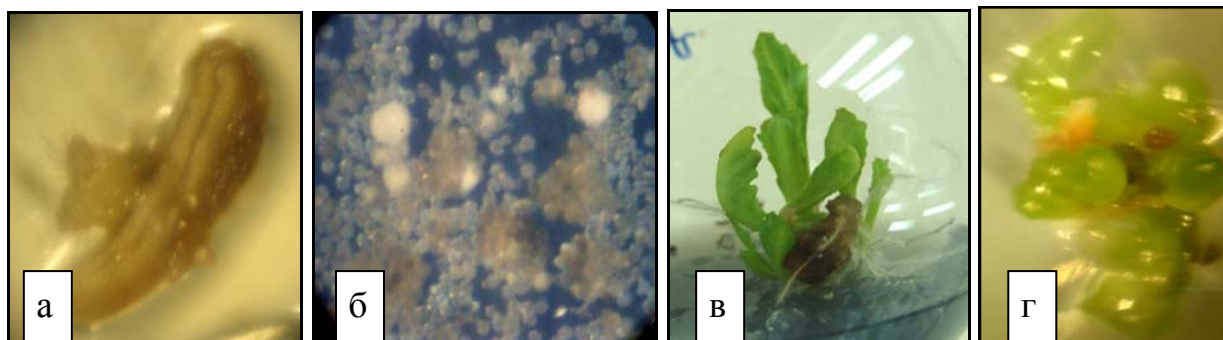


Рис. 7. Формирование каллусной ткани из микроспор, находящихся внутри пыльника белокочанной капусты (а, б), индукция образования адвентивных побегов из каллусной ткани (в), индукция прямого эмбриогенеза (г)

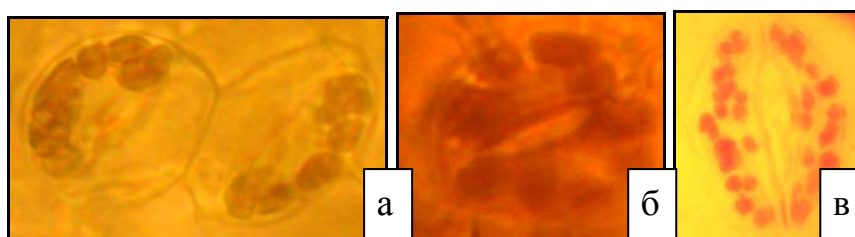


Рис. 8. Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц: а, б – растения-регенеранты, в – исходные растения белокочанной капусты

Для косвенного доказательства гаплоидной природы полученных растений-регенерантов белокочанной капусты применен метод подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Установлено, что количество хлоропластов в клетках устьиц растений-регенерантов в среднем составило 8 - 12 шт., в то время как у исходных донорных растений 18 - 22 шт. (Рис. 8).

Культура изолированных неопыленных завязей и семяпочек

В работе в качестве первичного экспланта использовали изолированные семяпочки неопыленных завязей, которые изолировали из цветочных бутонов и культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи В₅, а также цитокинины (кинетин - 0,5 - 1,5 мг/л; БАП - 0,5 - 1,5 мг/л; Дропп - 0,2 - 1,5 мг/л) и ауксины (НУК, 2,4-Д и ИУК в концентрациях 0,5 - 1,0 мг/л в различных сочетаниях).

При культивировании семяпочек на разных вариантах сред отмечалось образование либо каллусной ткани, либо формирование эмбриоидов. Эти процессы зависели от гормонального состава питательной среды. Так, присутствие кинетина в концентрации 1 мг/л в сочетании с 2,4-Д 1 мг/л приводило к формированию каллусной ткани из всех клеток семяпочек, а на среде с Дроппом 1,0 мг/л и ИУК 0,5 мг/л - эмбриоидов. В остальных вариантах отмечалось незначительное увеличение размера семяпочек, клетки которых в дальнейшем некротизировались, что приводило к полной гибели первичного экспланта.

Таким образом, был установлен регламент получения гаплоидных растений белокочанной капусты путем андрогенеза и гиногенеза.

Предложения для использования в селекционной практике

Для получения гаплоидных растений белокочанной капусты в культуре изолированных пыльников, микроспор и семяпочек необходимо:

- провести предобработку эксплантов по следующей схеме: обработка соцветий раствором нитрата серебра в концентрации 40 мг/л в течение 2 суток при температуре +4-6⁰С;

- отобрать бутоны с главного и боковых соцветий, расположенных на расстоянии от 0,5 до 2 см от верхушки соцветия;

- культивировать изолированные пыльники (светло-зеленого цвета) *in vitro* на среде, содержащей минеральные соли по прописи В₅, Дропп - 0,2 мг/л, НУК - 0,05 мг/л, а изолированные семяпочки - на среде В₅, Дропп - 1,0 мг/л и ИУК - 0,5 мг/л при температуре +32⁰С в течение 1 суток с последующим переносом эксплантов в стандартные условия культивирования (16-часовой фотопериод, температура 25⁰С, интенсивность освещения 5 тыс. лк);

- для увеличения коэффициента размножения применять питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС в сочетании с препаратом Дропп - 0,5 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л, сахара - 2%;
- для доказательства полученных гаплоидных растений проводить цитологический анализ по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и числа хромосом в клетках меристемы корня.

Идентификация гена устойчивости растений рапса к вирусу желтухи репы (*Turnip yellow virus* - TuYV)

Рапс поражается несколькими вирусными заболеваниями, из которых наиболее вредоносным является вирус желтухи репы (*Turnip yellow virus* - TuYV), который широко распространен во всем мире, и потери урожая от этой болезни составляют, например, в Германии от 12 до 34%, а в Австралии от 37- до 46% (Monique Juergens, Claudia paetsch et al., 2009).

Исходя из выше изложенного, представляют определенный интерес исследования по выявлению растений, содержащих фрагмент ДНК, отвечающий за устойчивость растений к этому вирусу. Для этого применяют современные методы молекулярного маркирования, например, ПЦР-анализ.

Известно, что важным этапом в этой методике является правильный подбор праймера. Ранее немецкие ученые (Monique Juergens, Claudia Paetsch et al., 2009) на растениях рапса экспериментально подобрали 2 праймера, которые идентифицировали фрагмент ДНК, отвечающий за устойчивость растений к вирусу TuYV. Эти праймеры и были нами взяты для работы и проверены на разных сортах и линиях рапса (Рис. 9). Праймер «344» идентифицирует фрагмент ДНК в областях 344 п.н. (устойчивый генотип) или в области 385 п.н. (восприимчивый генотип), а праймер «437» - в областях 437 п.н. (устойчивый генотип) или в области 376 п.н. (восприимчивый генотип).

Установлено, что в ДНК линий Титан 10, Лимегрин 2, Галиция 1 (Рис. 9), присутствует фрагмент, отвечающий за устойчивость растений к вирусу желтухи. Поэтому данные генотипы можно рекомендовать для включения в селекционный процесс при подборе родительских пар с целью создания сортов, устойчивых к данному вирусу.

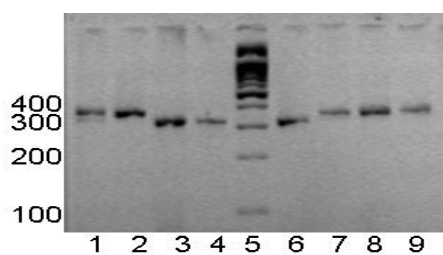


Рис. 9 Электрофореграммы продуктов ПЦР с использованием праймера «344»:
1 - сорт Серебрянин, 2 - линия Посейдон, 3 - линия Титан 10, 4 - линия Лимегрин 2, 5 - Маркер 100-3000 bp, 6 - линия Галиция 1, 7 - линия Кобра 2, 8 - линия Циклон 2, 9 - сорт Ханна

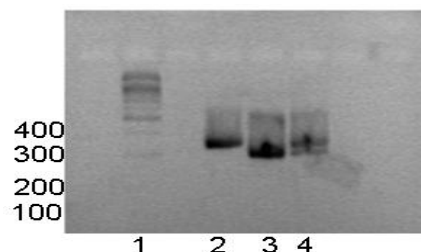


Рис. 10 Электрофореграммы продуктов ПЦР с использованием праймера «344»:
1 - Маркер 100-3000 bp, 2 - линия WF, 3 - линия Титан, 4 - гибрид WFxТитан

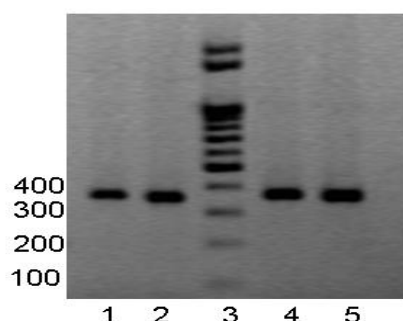


Рис. 11 Электрофореграммы продуктов ПЦР:
1 - гаплоид «WF xТитан», праймер 344, 2 - гаплоид «WF xТитан», праймер 437, 3 - Маркер 100-3000 bp, 4 - дигаплоид «WF xТитан», праймер 437, 5 - дигаплоид «WF xТитан», праймер 344

Исходя из полученных данных, праймер «344» был апробирован на гибриде WFxТитан, который ранее использовался нами в работе по получению гомозиготных линий и его родительских форм (WF и Титан) (Рис. 10). Как видно из рисунка 10, у гибрида WFxТитан обнаружены два фрагмента длиной 344 п.н. и 385 п.н., которые наследовались от родительских форм при скрещивании.

При анализе ДНК гаплоидных и дигаплоидных растений рапса, полученных *in vitro* из этого гибрида, присутствовал только один фрагмент длиной 385 п.н. (Рис. 11), что свидетельствует о восприимчивости этих растений к вирусу желтухи репы.

Выводы

1. Совершенствована технология и получены гаплоидные и дигаплоидные растений рапса (*Brassica napus* L.) и белокочанной капусты (*Brassica oleracea* L.) путем прямого эмбриогенеза из микроспор изолированных пыльников. Для белокочанной капусты оптимизирован первый этап получения растений-регенерантов из семяночек изолированных завязей.

2. Установлена зависимость стадии развития микроспор в пыльниках (однойядерная стадия развития) от расположения бутонов в главном и боковых соцветиях: для рапса целесообразно изолировать бутоны, расположенные в

средних рядах соцветия (1-4 ряд), для белокочанной капусты - с главного и боковых соцветий, расположенных на расстоянии от 0,5 до 2 см от его верхушки соцветия.

3. Предложена схема, обеспечивающая индукцию прямого эмбриогенеза из изолированных пыльников и микроспор, сочетающая совместное применение предобработки соцветий пониженными (+4-6⁰С в течение 2 суток) и повышенными (+32⁰С в течение 1 суток) температурами и обработку соцветий нитратом серебра в концентрации 40 мг/л.

4. Установлены оптимальные составы питательных сред для индукции прямого эмбриогенеза в культуре изолированных пыльников: для рапса - минеральные соли по прописи В₅, кинетин - 1 мг/л, НУК - 0,5 мг/л (частота эмбриогенеза – 2,4%); для белокочанной капусты - минеральные соли по прописи В₅, Дропп - 0,2 мг/л, НУК - 0,05 мг/л (частота эмбриогенеза - до 8,2%); для изолированных семяпочек белокочанной капусты – минеральные соли по прописи В₅, Дропп - 1,0 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л (частота эмбриогенеза – 1,1%).

5. Показано, что при культивировании сегментов гипокотилия и семядолей гаплоидных растений рапса на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС в сочетании с 2ip - 1 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л и сахараза - 2%, процесс дифференциации вторичных эмбриоидов происходит из эпидермальных клеточных слоев изолированных эксплантов.

6. Установлено положительное влияние торфо-дернового субстрата (в соотношении 1:1) на адаптацию растений-регенерантов рапса к условиям *in vivo*.

7. Установлено, что обработка гаплоидных растений рапса 0,5%-ным колхицином в сочетании с 4%-ным диметилсульфоксидом в течение 7 суток путем нанесения раствора на пазушные и верхушечные почки приводит к формированию фертильных цветков с последующим созреванием семян.

8. Использование праймеров «344» и «437» при проведении ПЦР-анализа позволило определить участки генов, отвечающих за устойчивость растений рапса к вирусу желтухи репы (*Turnip yellow virus* - TuYV). Выявлены три линии (Титан 10, Лимегрин 2, Галиция 1), которые можно рекомендовать для включения их в селекционный процесс при подборе родительских пар с целью создания сортов, устойчивых к данному вирусу.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Влияние пиридоксина на морфогенез изолированных пыльников растений различных видов *Brassica* // Материалы Международной научно-практической конференции, 2008 г. Саратов, 2008. – С. 150 - 151.

2. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных пыльников растений различных видов *Brassica* // Материалы Международной конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биотехнологии», 2008. Брянск, 2008. – С. 39 - 42.
3. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Создание гаплоидных растений рапса (*Brassica napus*) *in vitro* // Материалы V Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы нанобиотехнологии и инноваций с нетрадиционными ресурсами и создания функциональных продуктов», 2009. М., 2009. – С. 73-75.
4. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Содержание фенольных соединений в репродуктивных органах растений различных видов *Brassica* // Материалы VII Международного симпозиума по фенольным соединениям «Фундаментальные и прикладные аспекты», 2009. М., 2009. – С. 157-258.
5. Май Дык Чунг Оптимизация и совершенствование технологии получения гаплоидных растений различных видов *Brassica in vitro* // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов российских вузов», 2010. Томск, 2010. – С. 295 – 300.
6. Калашникова Е.А., Май Дык Чунг Технология получения гаплоидных растений вида *Brassica* в условиях *in vitro* методом андрогенеза // Докл. ТСХА / Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К.А. Тимирязева. Москва, 2010; Вып. 282. – С. 272-275.
7. Май Дык Чунг Экспериментальный андрогенез белокочанной капусты (*Brassica oleracea*) // Материалы Международной научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 145-летию Академии имени К.А. Тимирязева, 2010. М., 2010. – С. 64 - 67.
8. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Гаплоидные технологии *in vitro* в селекции растений // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», 2010. Волгоград, 2010. - С. 85 - 89.
9. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Разработка и усовершенствование технологии создания гаплоидных форм растений различных видов рода *Brassica* // Материалы X молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, живодноводстве и ветеринарии», 2010. М., 2010. – С. 31 - 32.
10. Май Дык Чунг, Калашникова Е.А., Соловьев А.А. Технология получения гаплоидных растений рапса (*Brassica napus*) *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2010, № 1. – С. 86-91.

11. Калашникова Е.А., Май Дык Чунг. Андрогенез и получение *in vitro* гаплоидных растений *Brassica napus* // Материалы II Международной конгресс-партнеринг и выставка по биотехнологии и биоэнергетике, 2010. М., 2010. – С. 86 - 87.
12. Калашникова Е.А., Май Дык Чунг. Получение гаплоидных растений белокочанной капусты // Картофель и овощи, 2010, № 8. – С. 26.
13. Калашникова Е.А., Соловьев А.А., Май Дык Чунг, Нгуен Тхань Хай. Применение гаплоидных технологий *in vitro* в селекции растений вида *Brassica* // Материалы Международной конференции «Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур», Казахстан, Алматы, 2010. – С. 127 – 128.
14. Калашникова Е.А., Май Дык Чунг, Соловьев А.А., Шевелуха В.С. Технология получения дигаплоидных растений рода *Brassica in vitro* // Доклады Россельхозакадемии, 2011, № 1. – С. 15-18. (в печати)