

УДК 633.81/.85:581.14:576.5

К.Ж. Жамбакин, М.Х. Шамекова, Д.В. Волков, А.К. Затыбеков,
Д.Л. Дауров, А.К. Жорабекова, А.Р. Халиков
Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы
*E-mail: alexbek89@mail.ru

Получение удвоенных гаплоидов рапса

В статье представлены результаты по введению в культуру изолированных пыльников и микроспор рапса с использованием сортов и гибридов первого поколения. Приводятся данные цитологического анализа мужского гаметогенеза, оптимизации стерилизации цветочных бутонов, питательной среды культивирования пыльников, индукции морфогенеза, регенерации и удвоения числа хромосом гаплоидных регенерантов. Оптимальной питательной средой для индукции эмбриогенных каллусов является среда Гамборга В5 (сахароза 90г/л, 66 мг/л хелата железа, 2,4Д - 0,5 мг/л, НУК – 0,25 мг/л). Наилучший результат по индукции эмбриогенных каллусов был получен у сортов Vale 310, SariGol, Nyola 504 Nyola 308. Проведена предварительная полевая оценка по фенологическим признакам, а также признакам урожайности, и содержанию масла полученных удвоенных гаплоидов рапса.

Ключевые слова: рапс, гибрид, культура пыльников, культура микроспор, цитология, гаплоид, дигаплоид.

K.Zh. Zhambakin, M.H. Shamekova, D.V. Volkov, A.K. Zatybekov,
D.L. Daurov, A.K. Zhorabekova, A.R. Halikov

Getting doubling haploids of rape

This article presents a result of the introduction to the culture of anthers and isolated microspores of rapeseed with using varieties and hybrids of the first generation. Provides data of the cytological analysis of male gametogenesis, optimize sterilization flower buds, cultivation mediums for the culture of anthers, induction of morphogenesis and regeneration and doubled haploid chromosome number of regenerated. Optimal medium for the induction of embryogenic callus is Gamborg B5 medium (sucrose 90g / l, 66 mg / l of iron chelate, 2.4D – 0.5 mg / l, NAA – 0.25 mg / l). The best result for the induction of embryogenic callus was obtained in sorts Vale 310, SariGol, Nyola 504 Nyola 308. A preliminary field evaluation on phenological characteristics and yield characteristics and oil content derived doubled haploid rape.

Keywords: rape, hybrid, the culture of anthers, isolated microspores culture, cytology, haploid, dihaploids.

К.Ж. Жамбакин, М.Х. Шамекова, Д.В. Волков, А.К. Затыбеков,
Д.Л. Дауров, А.К. Жорабекова, А.Р. Халиков

Рапстың екі еселенген гаплоидтерін алу

Мақалада бірінші ұрпақ сорттары мен гибридтерін қолдана отырып рапс өсімдігінің оқшауланған тозаңдықтар мен микроспораларына енгізу бойынша нәтижелері көрсетілген. Цитологиялық талдауды, аталық гаметогенезді, гүлшанақтардың зарарсыздандыруын, қоректік органы, тозаңдықтарды өсіруін, морфогенез индукциясын, регенерацияны және гаплоидты регенеранттардың хромосомалар сандарының екі еселенуін оңтайландыру туралы мәліметтер келтірілген. Эмбриогенді каллустар индукциясы үшін оңтайлы қоректік орта болып Гамборг В5 (сахароза 90 г/л, 66 мг/л темір хелаты, 2,4Д – 0,5 мг/л, НСҚ – 0,25 мг/л) ортасы табылады. Эмбриогенді каллустар индукциясы бойынша ең жақсы нәтиже Vale 310, SariGol, Nyola 504 Nyola 308 сорттарынан алынды. Фенологиялық белгілер, сондай-ақ алынған екі еселенген рапс гаплоидтарының өнімділік және май мөлшері бойынша алдын ала бағалау жүргізілді.

Түйін сөздер: рапс, гибрид, тозаңдықтар мәдениеті, микроспор мәдениеті, цитология, гаплоид, дигаплоид.

Введение

Создание генотипов рапса, адаптированных к почвенно-климатическим условиям Казахстана, как исходного материала для практической селекции невозможно без привлечения биотехнологических методов. В частности, с помощью гаплоидной биотехнологии за одну-две генерации можно получить стабильные гомозиготные линии, которые непосредственно оцениваются на перспективность для селекции. Кроме того, гаплоиды значительно расширяют генетическое разнообразие исходного селекционного материала, во-первых, за счет рекомбинаций при мейотическом делении в процессе гаметогенеза; во-вторых, за счет индуцированных или спонтанных мутаций, возникающих в процессе культивирования клеток *in vitro* [1].

Экспериментальное получение гаплоидов растений имеет давнюю историю. При этом использовались культура мужского гаметофита, культура женского гаметофита, скрещивание с гаплопродюсером. Для каждого семейства и рода подобран свой способ получения гаплоидов [2]. Для рапса наиболее популярным стал метод культуры изолированных пыльников и микроспор. Прежде всего, из-за доступности извлечения пыльников и высокой тотипотентности микроспор в одноядерной стадии гаметогенеза. Однако процесс индукции морфогенеза и регенерации растений в культуре мужского гаметофита зависит от множества факторов, которые очень трудно воспроизводить в различных лабораториях. В связи с чем необходимо проводить модификацию существующих протоколов, исходя из особенностей используемых генотипов, условий выращивания донорных растений и культивирования эксплантов.

Материал и методы

Материал. Цитогенетическое тестирование проводилось на сортах а, Крис, Таврион, Скиф, Гедемин, Антей и гибридах Крис х Гедемин, Таврион х Гедемин, Крис х Скиф.

Оптимизация культивирования пыльников проводилась с использованием сортов Ярвэлон, Шпат, Галант, Юбилейный, Крис, RG 5003, Sarig, SariGol, Nyola 308, Nyola 401, Nyola 504, Option, Vale 310, Vectra. При культивировании изолированных микроспор использовался сорт Крис.

Методы. Срезанные утром цветочные бутоны размером 3,0 – 4,0 мм в фазе одноядерной микроспоры, предварительно промывали дистиллированной водой. В дальнейшем экспланты помещали в холодильную камеру с температурой +4 +7°C на несколько суток [3].

Стерилизация цветочных бутонов проводилась следующим образом, перед стерилизацией бутоны: 1) промывали бидистиллированной водой, затем обрабатывали этиловым 70 % спиртом в течение 5 сек.; 2) промывали мыльным раствором (30 мин.), этиловым 70 % спиртом (3 сек.). После следовала 3-кратная промывка стерильной водой. В данной работе использовали модифицированную питательную среду Гамборга В5 [4,5]. Пыльники рапса извлекали и вводили в культуру *in vitro* на стадии одноядерной микроспоры. Изолированные пыльники пассировали в асептических условиях на питательную среду Гамборга В5 с содержанием 2,4-Д 0,1 мг/л и ИУК 0,1 мг/л. Для индукции каллусогенеза пыльники пассировали на питательную среду по 6 штук в одну пробирку. Количество питательной среды в каждой пробирке – 5 мл. Культивирование пыльников проводилось при температуре +23°C + 26°C, в термостате. Для индукции морфогенеза и эмбриогенеза каллусы пассировали на безгормональную среду МС и Гамборга В5 [6]. Растения-регенеранты культивировались на свету при 16-часовом фотопериоде (3000-4000лк), при температуре 22°C и относительной влажности воздуха 80-85% [7,8].

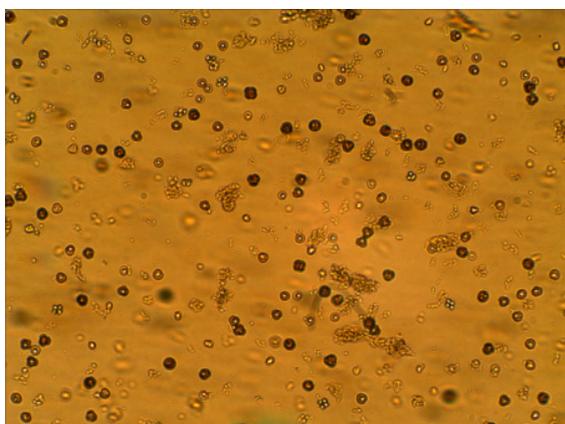
Регенерация растений проводилась на модифицированной среде Гамборга В5 с 2,0 мг/л ИУК, 1 мл/л БАП. Субкультивирование проводилось каждые 10 дней.

Изоляция микроспор проводилась по методу Ефтода [9] с нашими модификациями. Были собраны бутоны в количестве 117 шт сорта Крис. Сбор бутонов проводили рано утром в стадии одноядерной микроспоры в часы интенсивного деления пыльцы, размером 2,5-4,5 миллиметров. Предобработку соцветия вели в растворе нитрата серебра в концентрации 40 мг/л при температуре 4-10°C в холодной камере.

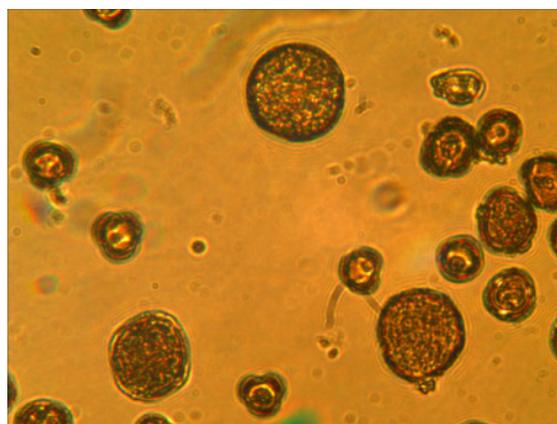
Стерилизация проводилась в 5-6%-ом растворе белизны (гипохлорита натрия) в течении 5 минут и в 70%-ом спирте в течение 30 секунд с последующим 3-5-кратным промыванием стерильной дистиллированной водой и порциями по 15-20 штук помещали на лист стерильной бумаги.

После стерилизации бутонов их помещали в прохладный микросмеситель, используя 5-10 мл прохладной среды В5 (10-12 °С), и гомогенизировали 5-7 сек. Суспензию от смесителя пропускали через фильтр и сливали в стерильную 50мл Falcon пробирку. Фильтрат центрифугировали в 250g в течение 10 минуты. Супернатант сливали, к осадку наливали 10мл среды и снова центрифугировали в течение 3 мин. В случае, если бутонов более 20, добавляли 20 мл среды. Повторяли промывку микроспор еще один раз. После заключительного промывания, микроспоры помещали в среду NLN с содержанием БАП 0,05

мг/л. Плотность микроспор определяли камерой Горяева, как известно, лучшие результаты эмбриогенеза получают при плотности микроспор равной 75,000 - 100,000 микроспор/мл. Затем их разливали по чашкам Петри в количестве 20мл и помещали в термостат с шейкером (40-50 оборота в минуту) при 32°С в течение двух суток. После двух суток температуру спускали до 25°С, при этом добавляли по 5 мл свежей среды в каждую чашку петри. В дальнейшем культивирование происходило темноте при 25°С и культивировали в течение 15 дней на медленном ротационном шейкере (рисунок 1).



(ув.х4)



(ув.х40)

Рисунок 1 – Культивирование микроспор

При появлении эмбриоидов культуру перенесли на свет. При достижении размеров 1,5 -2,5 мм эмбриоиды переносили на В5 среду (0,8 % агар) с 2%-ной сахарозой (GA3 в 0,1 мг/л), затем через две недели проводилась пересадка эмбриоидов на безгормональную среду В5, часть эмбриоидов, из которых не происходила регенерация, пересаживали на свежую В5 среду с 0,05 мг/л бензиладенином.

Полученные регенеранты в пробирках на питательной среде в фазе 3-х листочков были обработаны колхицином 0,05 % + ДМСО 2% + 10 мг/л гибберелловой кислоты, в течение 5 часов, и в концентрации 0,1%, 0,2%, 0,5% (+ ДМСО 2% + 10 мг/л гибберелловой кислоты) в 3-х повторностях в течение 1,5 часов (рисунок 2). После укоренения регенеранты были высажены и адаптированы в грунт (равные части почвы, песка и

торфа) в контролируемых условиях при температуре 25°С, влажности воздуха 50% и освещении 4000 люкс, при световом периоде 16 часов.

Масличность семян рапса гибридных линий и их родительских формах определялась методом упрощенного варианта, экстракционного метода определения масличности семян в аппарате Зайченко: метод основан на исчерпывающей экстракции липидов органическими растворителями.

Техника выполнения: навеску семян измельчают на лабораторной мельнице и переносят в предварительно взвешенный на весах второго класса патрон из фильтровальной бумаги; результаты взвешивания записывают до четвертого десятичного знака. Патрон изготавливают так же, как патрон для экстракционной насадки экстрактора Сокслета; размеры фильтровальной бумаги

для изготовления патрона – 7,5 x 18,5 см. В патрон переносят навеску измельченного материала массой около 4-5 г и вновь взвешивают на весах второго класса. Затем патрон помещают в экстрактор аппарата Зайченко и подвешивают к холодильнику с помощью двух проволочных ушек. Аппарат Зайченко состоит из подвешенного экстрактора, колбы и холодильника. Экстрактор представляет собой стеклянный стаканчик, имеющий плоское дно с отверстием и ушки для подвешивания к холодильнику. В нижней части холодильника, входящей в экстрактор, также есть ушки, к которым в рабочем положении подвешивается экстрактор. Колба аппарата имеет широкое горло, что значительно облегчает удаление растворителя при сушке. Экстрактор подвешивают так, чтобы дно его не касалось растворителя, в противном случае на стенках экстрактора после экстракции останется некоторая часть масла. К холодильнику присоединяют заранее высушенную в сушильном шкафу при 102-105 °С и взвешенную на весах второго класса колбу 2. Через верхнее отверстие холодильника 3 в колбу наливают эфир, заполняя ее так, чтобы дно экстрактора 1 не касалось поверхности эфира, нагревают водяную баню и проводят экстракцию в течение 8 ч, начиная с момента кипения эфира в колбе. Пары кипящего растворителя из колбы направляются в холодильник, конденсируются и непрерывно стекают в виде горячего растворителя в экстрактор. Через обезжириваемый материал непрерывно, в отличие от аппарата Сокслета, поступает свежий растворитель, что ускоряет процесс. По истечении процесса проверяют полноту экстракции точно так же, как в насадке экстрактора Сокслета, беря каплю растворителя из экстрактора на шлиф колбы или часовое стекло, и если экстрагирование закончено, отсоединяют колбу, отгоняют эфир с помощью отгонной установки и высушивают колбу в сушильном шкафу при температуре 102-105°С до постоянной массы. Первое взвешивание на весах второго класса проводят через 1 ч, последующие – через 30 мин. Колбу охлаждают перед взвешиванием в эксикаторе.

Масса колбы с маслом m , г. Масса колбы без масла m_1 , г. Масса семян m_2 , г. Массовая доля масла x к массе семян

$$x = (m - m_1) \cdot 100/m_2,$$

где m , m_1 – масса колбы соответственно с маслом и без него, г; m_2 – масса семян, г.

Одновременно с масличностью определяют содержание влаги семян методом высушивания при 102 – 105 °С до постоянной массы. Взвешивание проводят на весах второго класса; результаты записывают до четвертого десятичного знака так, как указано выше.

Пересчет масличности на сухое вещество семян:

$$x_1 = 100x/(100 - W),$$

где W – влажность семян, %.

За результаты анализа принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Вычисление ведут до второго десятичного знака, результат записывают до первого десятичного знака.

Цитологический анализ проводился методом приготовления давленных препаратов для изучения митотического деления [10,11].

Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге, чередуя: ночь в холодильнике, день ~ 23-25°С. Для приготовления препаратов использовали корешки 1-2 см длиной.

Поместили срезанные корешки в пенициллиновые флаконы с ~ 2 мл раствора 8-оксихинолина. Корешки обрабатывали при 14°С в течение 3 часов.

Обработанные корешки промывали в дистиллированной воде 3 раза по 5 мин.

Перенесли корешки в фиксирующий раствор 3:1 v/v 96% этанол: ледяная уксусная кислота. Фиксация: от нескольких часов до двух дней при комнатной температуре, если больше, то в холодильнике (лучше в холодильнике 2-4 дня). Если корешки необходимо сохранять дольше недели, можно поместить флаконы в морозильную камеру.

Для окрашивания поместили корешки в 2-4% ацетокармин.

Перед обработкой ферментами проростки промывают в пяти сменах холодной дистиллированной воды, выдерживая по 5-10 минут в каждой смене. Для насыщения цитратным буфером корешки помещают на 10 мин в данный буфер.

Отрезают меристемы корешков и помещают их в раствор смеси ферментов 0,1% пектиназы

и 0,1% целлюлазы в цитратном буфере при температуре 37°C. Цитратный буфер готовят из 23 частей лимонной кислоты (21,01 г/л), 27 частей цитрата натрия (29,41 г/л) и 50 частей дистиллированной воды. Время обработки подбирают экспериментально (не менее 30 минут).

Обработанные в ферментах меристемы используют для приготовления препаратов. Для быстрой остановки мацерации пробирки с меристемами можно перенести в ледяную воду. Как правило, меристемы не промывают от ферментов, поскольку при хорошей мацерации велика вероятность потери самих меристем. Аккуратно пастеровской пипеткой с длинным носиком отбирали меристему из пробирки и помещали на чистое предметное стекло, которое для лучшего прилипания клеток нужно протереть этанолом. Пипеткой удаляли лишнюю жидкость от меристемы и, не доводя до подсушивания, капали каплю 45%-ной уксусной кислоты, в которой с помощью препаративных игл тщательно измельчали меристему. После измельчения меристемы накрывают покровным стеклом. Излишек кислоты осторожно промокают фильтровальной бумагой и препарат раздавливают.

Результаты и их обсуждение

Введение в культуру пыльников. Предварительная холодовая обработка цветочных бутонов одно из основных средств, влияющих на успешное получение андрогенетических растений. При этом положительное влияние на индукцию каллусогенеза оказывает пониженная температура (+4 +7 °C). Низкие температуры сохраняют жизнеспособность клеток и тканей более длительное время, чем при обработке высокой температурой, что очень важно при массовой посадке пыльников за короткий промежуток фазы цветения. Воздействие на пыльники рапса пониженными положительными температурами в течение 5 суток является оптимальным и вводит микроспоры в состояние морфогенетической компетенции, повышая индукцию каллусогенеза. Отмечено, что воздействие холодной об-

работки более 7 суток оказывает отрицательное воздействие, происходит снижение индукции каллусогенеза, которое связано со снижением жизнеспособности пыльцы при некрозе тканей пыльника.

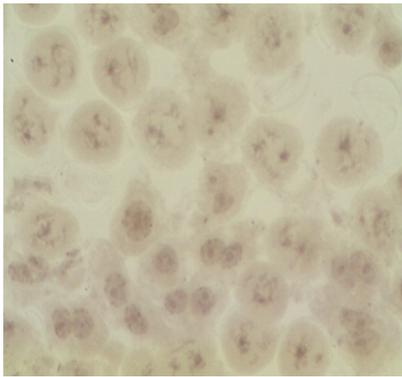
Цитогенетическое тестирование коллекционного и гибридного материала рапса. Как показано на рисунке 2, гаметогенез у коллекционных растений рапса проходит без нарушений, пыльца образуется фертильная. У сортов и гибридов не было обнаружено различий в протекании фаз гаметогенеза.

Мейотическое деление при гаметогенезе характеризовалось следующими особенностями. В диакенезе и метафазе I наблюдали нормальную конъюгацию хромосом, в результате чего образовались от 9 до 18 бивалентов, хромосомы в клетках анафаз I и диад равномерно расходились по полюсам; клетки метафаз II, анафаз II и тетрады также были без нарушений. У гибридных линий 87/02, 30/02, 34/02, 63/02 все фазы мейоза также протекали нормально. В тоже время у гибрида 72/02 наряду с нормальными пыльцевыми зернами встречались очень мелкие и крупные пыльцевые зерна. Определено, что для отбора пыльников в стадии одноядерной микроспоры следует отбирать цветковые бутоны размером 3-4 мм у полевых растений, поскольку в них содержится наибольшее количество одноядерных микроспор.

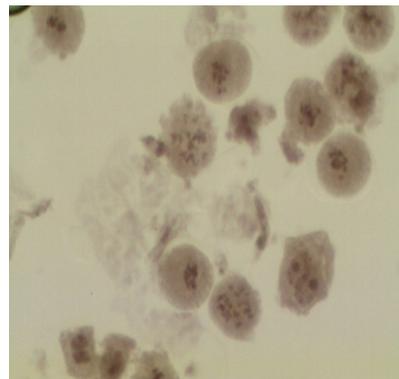
Одноядерная стадия имеет следующие характеристики: микроспора увеличена в размере, содержит одну большую вакуоль, хорошо развитую экзину, цитоплазма разрежена, ядро.

Митотическое деление у коллекционных образцов в основном протекает в норме, в единичных случаях отмечено наличие хромосомных мостов. Таким образом, гаметогенез у коллекционных растений рапса проходит без нарушений, пыльца образуется фертильная.

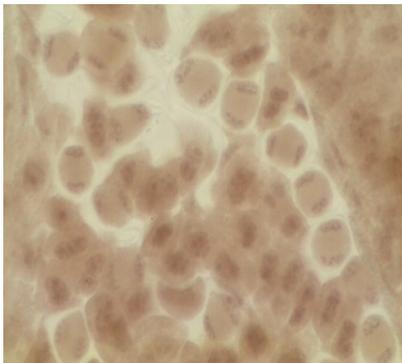
Отмечено различие в интенсивности окрашивания зрелых пыльцевых зерен в зависимости от генотипа. Возможно, что данная характерная особенность может служить тест-методом на отбор ценных генотипов по признаку масличности.



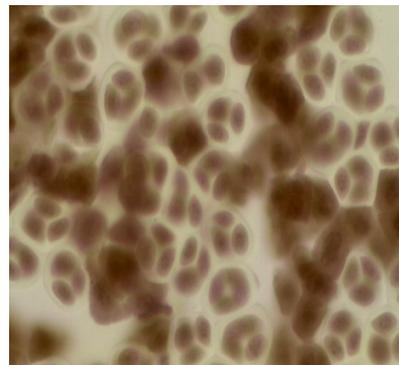
Профаза I мейоза (ув.х40)



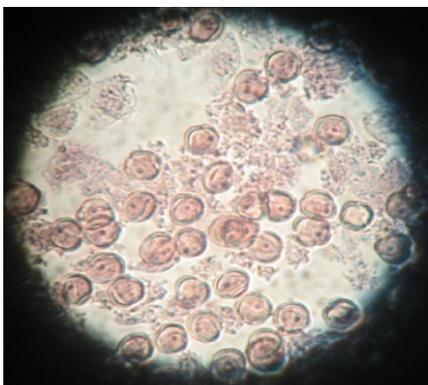
Метафаза I мейотического деления (ув.х40)



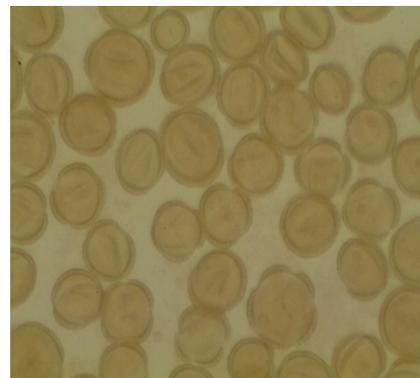
Анафаза I мейотического деления (ув.х40)



Тетрада микроспор (ув.х40)



Одноядерная микроспора (ув.х40)



Зрелые пыльцевые зерна (ув.х40)

Рисунок 2 – Гаметогенез рапса

Оптимизация условий морфогенеза и регенерации *in vitro* при культивировании пыльников рапса

На первом этапе необходимо было определить оптимальную базовую питательную среду для культуры пыльников рапса. Исходя из анализа литературных источников, наиболее популярными

для индукции каллусо- и эмбриогенеза в культуре пыльников являются питательные среды Линсмаера и Скуга, Бладза и Гамборга (В 5) [7,12]. Оптимизацию питательных сред проводили на сортообразцах, с тем, чтобы влияние генотипа было наименее выраженным.

Результаты (таблица 1) показали, что опти-

мальной базовой средой является среда Гамборга (B5). Практически все генотипы показали на этой среде лучшие результаты. В дальнейшем проводилась оптимизация питательной среды Гамборга (B5). В процессе культивирования

нами не выявлена индукция эмбриоидов. На всех вариантах сред и генотипов появлялись только каллусы. Классификацию каллусов проводили на втором этапе – этапе оптимизации среды Гамборга B5.

Таблица 1 – Индукция каллусогенеза (%) в культуре пыльников рапса

| Образцы | Linsmaira, Skoog | Blaydes | Gamborga(B 5) |
|-----------|------------------|-----------|---------------|
| Ярвэлон | 0,55±0,05 | 0,50±0,05 | 0,55±0,05 |
| Шпат | 2,17±0,37 | 3,55±0,13 | 3,33±0,33 |
| RG -5003 | 1,55±0,12 | 2,71±0,12 | 3,59±0,55 |
| Sarig | 3,33±0,15 | 2,71±0,21 | 5,88±0,81 |
| Huola 504 | 2,10±0,17 | 3,33±0,33 | 3,33±0,33 |
| Option | 3,15±0,22 | 0,50±0,05 | 5,50±0,50 |

С целью оптимизации морфогенеза на среде Гамборга B5 изучено 6 вариантов питательной с различными вариантами 2,4 Д и НУК. Морфология каллусов меняется в процессе культивирования. Через 24-30 суток после посадки вдоль разорванной оболочки пыльника можно было заметить появление бело-желтых каллусов, которые в дальнейшем изменялись. Дальнейшее культивирование показало, что рыхлые, бесцветные каллусы не имели дальнейшего развития, но в случае пересадки на безгормональную среду могли образовать морфогенные зоны.

Второй тип каллусов в дальнейшем, либо

сразу давал начало органогенезу (листьям и корням), либо на их поверхности можно было наблюдать образование эмбриоидов.

Результаты культивирования пыльников показали (таблица 2), что добавление в среду нафтилуксусной кислоты стимулировало индукцию каллусов практически у всех изученных образцов. Наибольший каллусогенез был получен у сортов Sarig и Шпат. Кроме того, было отмечено, что в процессе культивирования на средах в присутствии НУК на каллусные культуры индуцировали эмбриогенез. В тоже время на средах без НУК эмбриогенных каллусов практически не наблюдалось.

Таблица 2 – Оптимизация каллусогенеза (%) при культивировании пыльников рапса на питательную среду Гамборга-B5

| Образец | 2,4 Д (мг/л) | | | 2,4 Д+НУК(мг/л) | | |
|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------------|---------------|---------------|
| | 0,25 | 0,5 | 2,5 | 0,25 + 0,25 | 0,5 + 0,25 | 2,5 + 0,25 |
| Ярвэлон | 0,15±0,07 | 0,61±0,05 | 0,65±0,07 | 5,55±0,21 | 7,50±0,33 | 5,50±0,27 |
| Шпат | 3,31±0,10 | 3,32±0,12 | 5,00±0,17 | * | 10,00±0,33 | 10,0±0,33 |
| RG 5003 | 2,52±0,06 | 4,21±0,13 | 5,00±0,17 | 6,31±0,07 | 12,70±0,34 | 12,5±0,53 |
| Sarig | 5,00±0,15 | 4,40±0,15 | 7,10±0,16 | 10,62±0,31 | 23,50±0,31 | 20,00±0,20 |
| Huola 504 | 2,10±0,13 | 5,47±0,12 | 3,20±0,21 | 5,42±0,17 | 16,85±0,17 | 11,70±0,34 |
| Option | 5,00±0,15 | 4,10±0,07 | 4,10±0,07 | - | 8,63±0,27 | 5,50±0,20 |

Примечание: * - эксперимент не проводился

Дальнейшее пассирование происходило на среде Мурасиге и Скуга (МС) либо Гамборга В5 с пониженной концентрацией сахарозы – 20 г/л, половинным набором хелата железа и повышенном содержании 2,4Д (2,0 мг/л). При дальнейшем пассировании эмбриогенные каллусы могли быть успешно клонированы без потери регенерационных способностей в течение 3-х месяцев. Неэмбриогенные каллусы в присутствии НУК на второй, третий пассаж могли образовывать эмбриогенные зоны. Появление эмбриогенных зон

можно было вызвать пассированием каллусов на безгормональную среду МС и Гамборга В5.

Полученные на различных вариантах эмбриогенные каллусы по мере появления были высажены на среду для регенерации Гамборга В5 с 0,1 мг/л ИУК, 1 мл/л БАП.

В дальнейшем посадка пыльников проводилась только на среду Гамборга В5 с 2,4Д – 0,5 мг/л, и НУК – 0,25 мг/л. Результаты, представленные в таблице 3, показывают только образование первичных эмбриогенных каллусов.

Таблица 3 – Получение регенерантов рапса из пыльников на оптимизированной питательной среде Гамборга В5

| Название | Образование каллусов, % от количества пыльников | Количество культивируемых эмбриогенных каллусов | Кол-во регенерантов | Получено растений % |
|-----------|---|---|---------------------|---------------------|
| RG 5003 | 50±3 | 10 | 7 | 70 |
| Юбилейный | 47±2,5 | 13 | 5 | 38 |
| SariGol | 80±5 | 12 | 9 | 74 |
| Крис | 56±4 | 23 | 7 | 30 |
| Hyola 308 | 75±4,7 | 14 | 8 | 57 |
| Hyola 401 | 45±2,3 | 14 | 4 | 28 |
| Галант | 67±4,4 | 17 | 12 | 70 |
| Vale 310 | 81±5 | 13 | 6 | 46 |
| Vectra | 56±4 | 16 | 9 | 56 |
| Hyola 504 | 73±4,6 | 9 | 5 | 55 |

Культура изолированных микроспор. Формирование многоклеточных структур происходило на 3-й 5-й день культивирования (рисунок

3). В результате были получены эмбриониды в количестве 503 шт в культуре изолированных микроспор на среде NLN.



Рисунок 3 – Полученные гаплоидные эмбриониды

Удвоение хромосом и выращивание растений до семян

В результате проведенных цитологических исследований нами было установлено, что активное митотическое деление у растений - регенерантов приходится на 12 часов ночи, 5 часов и 7 часов утра. Проведенный кариологический анализ полученных регенерантов генотипов Шпат, Нуола 308, Нуола 401, Option и 10 гибридных линий показал, что основное количество растений содержит гаплоидный набор хромосом – 19, среди регенерантов встречаются линии с анеуплоидным набором хромосом – 18 и 21.

Была проведена отработка метода удвоения

хромосом. Растения испытывали очень сильное угнетение. В варианте 0,5 % колхицина все растения погибли. Наилучшие результаты были получены при вариантах с 0,05 % и с 0,1 % колхицина.

Развитие растений проходило нормально, по фенологическим, морфологическим и основным количественным признакам растения не отличаются от родительских форм, получены семена второго поколения (рисунок 4).

Семена дигаплоидов первого поколения (DH-1), полученных из гибридов F1 трёх гибридных линий: Крис x Гедемин, Таврион x Гедемин, Крис x Скиф были пророщены и микрочно размножены (5 регенерантов каждой линии).

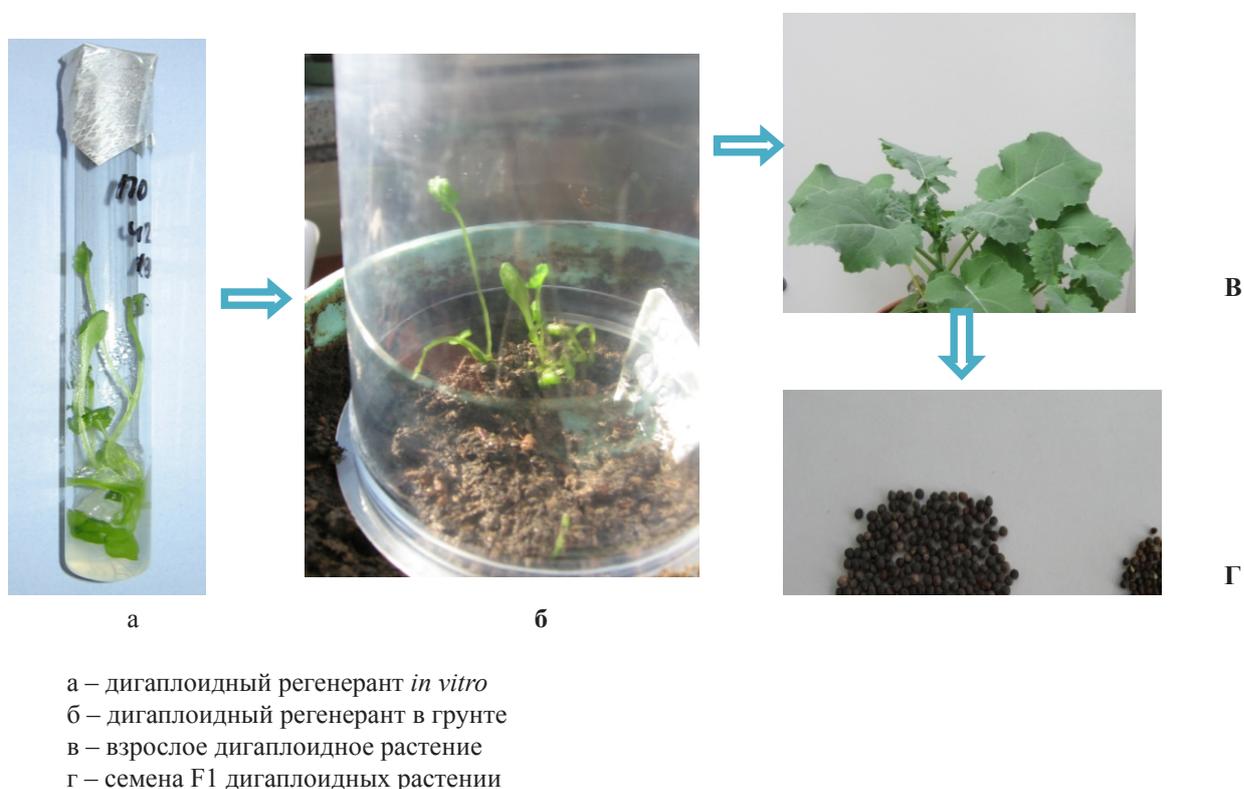


Рисунок 4 – Андрогаенные регенеранты рапса

Оценка дигаплоидных линий

Первичные дигаплоидные (DH-1) семена из гибридов F1, следующих трёх гибридных линий: Крис x Гедемин, Таврион x Гедемин, Крис x Скиф были посеяны в полевых условиях с родительскими формами по 20 семян каждой линии.

Дигаплоидные линии первого поколения имеют по сравнению с родительскими формами более позднюю бутонизацию, при этом образование стручков и полное созревание происходит несколько раньше, так же они уступают родительским формам по высоте растения, количеству стручков в растении, массой семян с растения (таблица 4).

Таблица 4 – Структурный анализ дигаплоидных гибридных линий первого поколения и их родительскими формам

| Сорта | Высота, см | | Количество, шт | | Масса семян с растения, г | Длина стручка, см | Масса 1000 семян, г |
|------------------------|------------|-----------|----------------------|-----------------|---------------------------|-------------------|---------------------|
| | растения | ветвления | стручков на растении | семян в стручке | | | |
| Крис | 143,6±0,4 | 92,4±0,7 | 116,4±0,3 | 26,0±0,3 | 7,3 | 5,3 | 3,273 |
| Таврион | 136,4±0,6 | 52,5±0,6 | 98,4±0,6 | 23,7±0,2 | 6,1 | 5,4 | 2,459 |
| Скиф | 137,8±0,6 | 69,8±0,3 | 155,4±0,3 | 26,6±0,6 | 5,9 | 5,2 | 2,654 |
| Антей | 132,5±1,0 | 51,3±0,4 | 179,6±0,2 | 26,4±0,6 | 9,7 | 5,5 | 3,123 |
| ДН-1(Крис х Гедемин) | 115,5±0,8 | 55,7±0,7 | 95,4±0,7 | 21,0±0,5 | 5,3 | 5,6 | 2,605 |
| ДН-1(Таврионх Гедемин) | 120,1±0,6 | 56,8±0,3 | 87,5±0,6 | 23,5±0,8 | 5,5 | 5,4 | 2,767 |
| ДН-1(Крис х Скиф) | 112,7±0,4 | 50,5±0,6 | 100,6±0,8 | 22,7±0,6 | 4,9 | 5,7 | 2,876 |

Дигаплоидные линии по количеству масла в семенах не уступают исходным формам (таблица 5). Полученные дигаплоиды являются новыми гомозиготными линиями рапса с высокими

качественными показателями пищевого и кормового использования и могут потенциально испытываться на заключительных этапах селекции для получения новых отечественных сортов.

Таблица 5

| Наименование образца | Содержание масла, % |
|-------------------------|---------------------|
| Крис | 46 |
| Таврион | 47 |
| Скиф | 45 |
| Антей | 47 |
| ДН1 (Крис х Гедемин) | 46 |
| ДН1 (Таврион х Гедемин) | 46 |
| ДН1 (Крис х Скиф) | 45 |

Содержание масла в дигаплоидных гибридных линиях первого поколения и их родительских формах

Заключение

В результате проведенных исследований по введению в культуру изолированных пыльников и микроспор рапса. Определено, что отбор для культуры пыльников следует отбирать цветковые бутоны размером 3 – 4 мм при выращивании

растений в полевых условиях, поскольку в них содержится наибольшее количество одноядерных микроспор.

Добавление в среду нафтилуксусной кислоты стимулировало индукцию каллусов практически у всех изученных образцов. Оптимальной питательной средой для индукции эмбриогенных каллусов является среда Гамборга В5 (сахароза 90г/л, 66 мг/л хелата железа, 2,4Д - 0,5 мг/л, НУК – 0,25 мг/л). Наилучший результат по индукции эмбриогенных каллусов был получен у сортов

Vale 310, SariGol, Nyola 504 Nyola 308. Модифицирована методика культивирования изолированных микроспор. Подобраны оптимальные параметры удвоения хромосомного набора гаплоидных регенерантов. Дигаплоидные линии первого поколения были высеяны в полевых ус-

ловиях с родительскими формами и проведена их селекционная оценка. Полученные дигаплоидные линии имеют хорошую масличность, но уступают родительским формам по высоте растения, количеству стручков в растении, массе семян с растения.

Литература:

- 1 Жамбакин К. Ж. Гаплоидная биотехнология растений. – Алматы, 2004. – 186 с.
- 2 Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна. – Тверь: Формат, 2000. – 179 с.
- 3 Dias J.S., Martins M.G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes // *Sei Hort.* – 1999. – V. 82. – P. 299-307.
- 4 Май Д. Ч., Калашникова Е.А. Гаплоидные технологии in vitro в селекции растений // *botanicblog.ru.* – 2010.
- 5 Давыдова Н. Н. Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.): автореф. канд-т биол. наук. М., 2008. – С. 25.
- 6 Lichter R. Anther culture of Brassica napus in a liquid culture medium // *Z.Pflanzenphysiol.* – 1981. – Vol.103. – P.229-237.
- 7 Муравлёв А. А. Культура пыльников в селекции ярового рапса // Автореф. канд-т биол. наук. – Саратов, 2007. – С. 29.
- 8 Май Д. Ч., Калашникова Е.А. Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных пыльников растений различных видов *Brassica* // *Материалы Международной конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биотехнологии».* – Брянск, 2008.
- 9 Swanson E. B. Microspore culture in Brassica // *Methods in Molecular Biology / Plant Cell and Tissue Culture.* – 1990. – Vol. 6. – P. 159-169.
- 10 Пухальский В. А., Соловьев А. А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетика растений. – М.: Колос. – 2007.
- 11 Паушева З. Н. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат. – 1988. – 271 с.
- 12 Dias J. S. Effect of activated charcoal on Brassica oleracea microspore culture embryogenesis // *Euphytica.* –1999. – Vol.108. N 1. – P. 65-69.

References

- 1 Zhambakin K.Zh. Haploid biotechnology of plant. –Almaty. – 2004. -186 p.
- 2 Polyakov A.V. Biotechnology in flax breeding. -Tver: Format, 2000. – 179 p.
- 3 Dias J.S., Martins M.G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes // *Sei Hort.* – 1999. – V. 82.– P. 299-307.
- 4 May D.H., Kalashnikova E.A. Haploid technology in vitro in plant breeding // *botanicblog.ru.* – 2010.
- 5 Davydova N.N. Improvement of anther culture method for use in the breeding of cabbage (*Brassica oleracea* L.) // *Abstract of thesis.* – Moscow. – 2008. – P. 25.
- 6 Lichter R. Anther culture of Brassica napus in a liquid culture medium // *Z.Pflanzenphysiol.* – 1981. – Vol.103. – P.229-237.
- 7 Muravlev A. A. Anther culture breeding in spring rape // *Abstract of thesis.* -Saratov. – 2007. – P. 29.
- 8 May D. H., Kalashnikova E.A. Experimental morphogenesis in anther culture isolated from different species of Brassica // *Materials of the International Conference of young scientists “The fundamental and applied aspects of modern biotechnology”*, Bryansk. – 2008.
- 9 Swanson E. B. Microspore culture in Brassica // *Methods in Molecular Biology / Plant Cell and Tissue Culture.* – 1990. – Vol. 6. – P. 159-169.
- 10 Puhalskiy V.A., Soloviev A.A., Badaeva E.D., Yurczev V.N. Workshop by Plants cytology and cytogenetics. – Moscow: Kolos. – 2007.
- 11 Pausheva Z. N. Workshop by Plants cytology. -Moscow: Agropromizdat. -1988. – 271 p.
- 12 Dias J. S. Effect of activated charcoal on Brassica oleracea microspore culture embryogenesis // *Euphytica.* –1999. – Vol.108. N 1. – P. 65-69.