УДК 635.342:573.6

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ *BRASSICA OLERACEA* L. *IN VITRO*

Киракосян Р.Н.[1] *– аспирант генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства*
Калашникова Е.А.[1] *– доктор биол. наук, профессор кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства*
Бондарева Л.Л.[2] *– доктор с.-х. наук, зав. лабораторией селекции и семеноводства капустных культур*

[1]*ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева*
127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.49
E-mail: mia41291@mail.ru; kalash0407@mail.ru

[2]*ФГБНУ «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур»*
143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
E-mail: vniissok@mail.ru

Установлена роль растительных экстрактов в процессе индукции эмбриогенных структур и дальнейшего их развития в растения. Добавление в состав питательной среды экстрактов с применением в качестве растворителя DMSO повышает частоту андро- и гиногенеза на 2,4 % по сравнению контрольным вариантом. Экспериментально доказано, что растительный экстракт, полученный из репродуктивных органов определенного генотипа, повышает морфогенетический потенциал изолированных органов только этого же генотипа.

Ключевые слова: *капуста белокочанная, изолированные пыльники, изолированные завязи, растительные экстракты, андрогенез, гиногенез*

Введение

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L.) – универсальная культура, широкому распространению которой способствовали ее ценные хозяйственные свойства: высокая урожайность, наличие большого сортового разнообразия различной спелости, а также лежкоспособность используемых органов, что позволяет иметь свежую продукцию в течение круглого года. В кочанах капусты белокочанной в обилии содержатся витамины Р, К, B_1, B_2, РР, С, инозит, фолиевая кислота, биотин, а также калий, фосфор, кальций, железо и марганец. Кроме того, капуста является хорошим источником сахаров и легкоусвояемых белков. По содержанию азотистых веществ она превышает брюкву, репу, морковь, свеклу (Петрушко Ю.Н., 2003).

В настоящее время актуальным стало использование технологий, а также сортов и гибридов, приводящих к получению продукции с высокой выровненностью и урожайностью. Сочетание таких важных хозяйственно ценных признаков имеют гетерозисные гибриды капусты. Поэтому создание таких гибридов является приоритетным направлением исследований в селекции данной культуры (Литвинов С.С., 2003).

Решение большинства практических задач селекции во многом может определяться эффективностью вовлечения современных методов биотехнологии в селекционный процесс. Значительное место в решении этих задач занимает клеточная селекция, основанная на отборе клеточных популяций, устойчивых к селективному фактору, и регене-

рации из них растений, а также гаплоидные технологии (Калашникова Е.А., 2003; Поляков А.В., 2003).

Использование удвоенных гаплоидных линий позволяет проводить более эффективно отбор желательных генотипов из сравнительно небольших популяций по сравнению с традиционной технологией выделения самоопыленных генотипов (Lazar M.D. 1984). Кроме того, поскольку у гаплоидов отсутствует явление доминантности, их можно успешно использовать в мутационной селекции, а также для передачи генов от полиплоидных видов диплоидным, при решении теоретических вопросов, связанных с происхождением видов, созданием серий моносомиков (Ницше Н., Венцель П., 1980). Включение гаплоидных технологий в схему классической селекции позволит сократить селекционный процесс на 4 поколения (Chu C.C., 1978).

Получение гаплоидных растений возможно посредством андрогенеза *in vitro*, гаплоиндуктора, гиногенеза, партеногенеза (апомиксис), полиэмбрионии. Наиболее перспективным подходом к разработке технологии получения гаплоидных растений – это культивирование изолированных пыльников или пыльцы *in vitro* (Шмыкова Н.А., 2009).

Работы по получению гаплоидных растений у представителей рода *Brassica* ведутся во многих странах. Однако факторы, от которых зависит эффективность пыльцевого эмбриогенеза, еще недостаточно изучены. В связи с этим работы по выявлению сортов, гибридов, линий, обладающих высокой гаплоидной способностью и установление факторов, оказывающих влияние на этот процесс, являются актуальными.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили изолированные пыльники и завязи сортов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) селекции ВНИИССОК: Зимовка 1474, Слава грибовская 231, а также селекционный материал (инбредные линии и селекционные формы капусты белокочанной разных групп спелости), полученные в лаборатории селекции и семеноводства капустных культур ВНИИССОК. Растения-доноры выращивали в плеточной не обогреваемой теплице, в камерах искусственного климата лаборатории и в полевых условиях открытого грунта ВНИИССОК.

Работа проводилась на бутонах, которые изолировали как с главного, так и боковых побегов. В исследованиях применяли схему комплексной предобработки соцветий пониженными температурами (+4...6°С) в течение 3-х суток в сочетании с обработкой соцветий растворами регуляторов роста (препарат Дропп, ИУК). В качестве контроля был выбран вариант предобработки соцветий водой.

Для поверхностной стерилизации бутонов в качестве стерилизующего агента применяли сулему в концентрации 0,1%. Изолированные бутоны выдерживали в сулеме в течение 3-4 минут, после чего их промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды. Пыльники и завязи асептически извлекали из бутонов в условиях ламинар-бокса и культивировали на индуцирующих питательных средах МС в чашках Петри, которые помещали в климакамеру (Binder, Германия) и инкубировали в темноте при температуре 35°С в течение 5-ти суток, после

Рис. 1. Схема получения растительных экстрактов.

чего температурный режим уменьшали до 25°С.

В этих условиях экспланты выращивали в течение 25 суток и затем переносили в световую комнату, где был установлен 16-часовой фотопериод и освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 5 тыс. лк.

В работе изучали влияние растительных экстрактов, полученных из пыльников и завязей капусты на морфогенетический потенциал изолированных репродуктивных органов.

Растительный экстракт получали из пыльников и завязей растений капусты белокочанной, выращенных в камерах искусственного климата и теплице ВНИИССОК. Для получения экстракта брали сырую биомассу образцов (от 200 до 350 мг), которые экстрагировали 100% растворителями (вариант 1 – ацетон, вариант 2 – DMSO, вариант 3 –спирт, вариант 4 – вода), путем растирания ее в ступке. После этого полученную массу помещали в стеклянные пробирки и выдерживали в течении 1 часа при температуре 23° С, после чего экстракты фильтровали через фильтровальную бумагу и затем стерилизовали путем пропускания их через бактериальный фильтр (Millipore, pore size 0,45 μM). Экстракты добавляли в питательную среду перед ее разливом по чашкам Петри в концентрации 1 мл/ 100 мл среды. В качестве контроля была принята питательная среда, не содержащая растительный экстракт. Схема эксперимента приведена на рисунке 1. Исследования проводили в трех повторностях.

В работе придерживались правил работы в стерильных условиях, разработанных на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю. и др., 2014).

Результаты и их обсуждение

Известно, что частота андро- и гиногенеза *in vitro* зависит от ряда факторов гормональной и негормональной природы: микроэлементов, витаминов, компонентов углеводного и азотного питания, фитогормонов и гормоноподобных веществ синтетического и природного происхождения. Однако, изменяя соотношение и концентрацию этих веществ в питательной среде, частота эмбриогенеза в культуре изолированных репродуктивных органов не превышает, как правило, 4 %. Одним из путей повышения морфогенетического потенциала культивируемых клеток является включение в состав питательной среды растительных экстрактов (Бутенко Р.Г., 1999).

В данной работе растительные экстракты, полученные из репродуктивных органов *Brassica oleracea* L., были взяты не случайно, так как известно, что именно в пыльце и незрелых семенах присутствуют важнейшие представители природных брассиностероидов: гомобрассинолид, норбрассинолид, эпибрассинолид и др. Эти вещества контролируют процессы роста, дифференцировки и размножения растений (Бахтенко Е.Ю., Курапов П.Б., 2014).

В результате проведенных исследований нами было установлено, что культивирование пыльников и завязей в контрольном варианте (без растительных экстрактов), а также в вариантах 1 (ацетон), 3 (спирт) и 4 (вода) процессы андрогенеза и гиногенеза не были получены. Однако, следует отметить, что присутствие в составе питательной среды растительных экстрактов из вариантов 1 и 3 приводило к увеличению числа жизнеспособных пыльников и завязей, по сравнению с вариантом 4 (вода) и контролем. В последних вариантах наблюдалась гибель пыльников и завязей уже на 20 сутки, в то время как в вариантах 1 и 3 (ацетон и спирт, соответственно) этот процесс был отмечен лишь на 58 сутки с начала культивирования. Исключение составил вариант 2 (DMSO), в котором частота гиногенеза составила 2,4 %, а процесс образования андроклинных структур не был отмечен (рис. 2). Кроме того, экспериментально доказано, что растительный экстракт, полученный из репродуктивных органов определенного генотипа, повышает морфогенетический потенциал изолированных органов только этого же генотипа.

В дальнейшем сформированные эмбриоиды отделяли от первичного экспланта и переносили на среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, а также гормоны ИУК – 2 мг/л, БАП – 1 мг/л, сахарозу – 3 %, агар - 7 г/л. В этих условиях формировались растения, которые проявили высокую способность к последующему размножению (рис. 3).

Таким образом, экспериментально показано, что растительные экстракты на основе DMSO оказывают положительное влияние на процессы морфогенеза *in vitro*. Его действие объясняется тем, что данное химическое вещество является хорошим растворителем, обладает высокой проницаемостью, а, следовательно, усиливает перенос элементов питательной среды в растительную клетку.

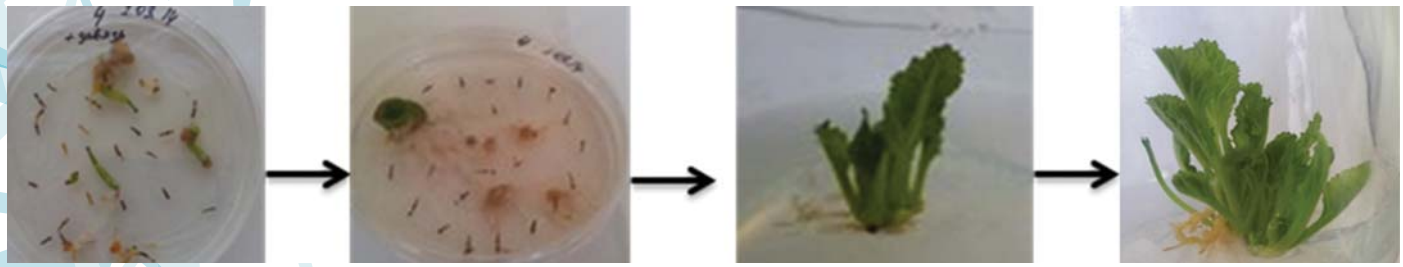

Рис.2. Этапы получения растений-регенерантов капусты белокочанной in vitro.

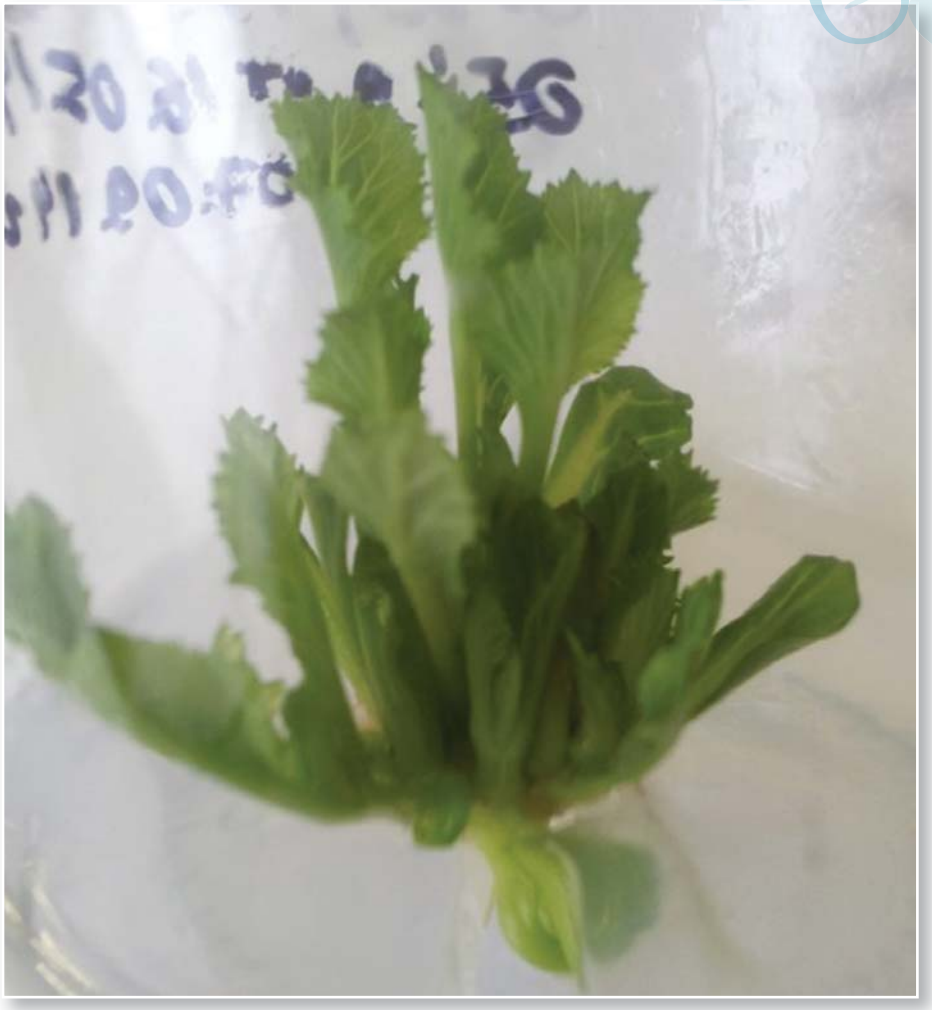

Рис.3. Растения-регенеранты капусты белокочанной, полученные из завязи.

EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON THE MORPHOGENETIC POTENTIAL OF ISOLATED ORGANS OF BRASSICA OLERACEA L. IN VITRO

Kirakosyan R.N., [1]
Kalashnikova E.A., [1]
Bondareva L.L. [2]

[1] Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A.Timiryazev , Agronomy Faculty, Department of Genetics and Biotechnology, 49 Timiryazevskaya St., 127550,Moscow,Russia, tel.8(499)976-40-72 e-mail: mia41291@mail.ru, kalash0407.@mail.ru
[2] Federal State Budgetary Scientific Research Institution "All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production" 143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district, p. VNIISSOK, Selectionnaya street, 14 E-mail: vniissok@mail.ru

Abstract
The role of plant extracts in the process of induction of embryogenic structures and its following development in plants is revealed. Thus, the addition in the culture medium of the extracts diluted in DMSO increases the rate of gyno- and androgenesis on 2.4% as compared with control. Experimentally proved that the plant extract derived from the reproductive organs of certain genotype increases the morphogenetic potential of isolated organs only of the same genotype.

Keywords: *white head cabbage, isolated anthers, isolated ovules, plant extracts, androgenesis, gynogenesis.*

Литература

1. Бахтенко, Е.Ю., Курапов П.Б. Регуляция роста и развития растений: учебное пособие / Е.Ю. Бахтенко, П.Б.Курапов: Мин-во образования и науки РФ: Вологодский гос. пед. ун-т. – Вологда: ВГПУ, 2014. – 192 с.
2. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р.Г.Бутенко – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Калашникова, Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: Дис. Док. Биол. наук: М.: ТСХА, 2003. – 279 с.
4. Калашникова, Е.А. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е.А. Калашникова, М.Ю. Чередниченко, Н.П. Карсункина, М.Р. Халилуев. Изд. 3-е, испр. и доп. Изд-во РГАУ-МСХА, - 2014. - 147 с.
5. Литвинов, С.С. Овощеводство России и его научное обеспечение (состояние, приоритеты, перспективы). – М.: ВНИИО, 2003. – 35 с.
6. Ницше, В. Гаплоиды в селекции растений. /В. Ницше, Г. Венцель - М.: Колос, 1980. – 128с.
7. Петрушко Ю.Н., Потемкина В.И., Федяй В.П. Белокочанная капуста. Современная ресурсосберегающая технология выращивания в условиях Приморского края. — Уссурийск, 2003. – 76 с.
8. Поляков, А.В. Основные направления использования биотехнологических методов в селекции овощных культур / А.В. Поляков // Селекция, семеноводство и биотехнология овощных и бахчевых культур (Доклады III Международной конференции, посвященной памяти Б.В. Квасникова) / М.: ВНИИО, 2003. – С. 29-33.
9. Шмыкова, Н.А. Гаплоидия у томата. Перспективы создания гомозиготных линий на основе гиногенеза и андрогенеза in vitro / Н.А. Шмыкова // Овощи России, 2009. – №1. – С.12-16.
10. Chu, C.C. The N6 Medium and its Applications for Anther Culture of Cereal Crops /C.C. Chu //Proc. Plant. Tissue culture bening Geience Press. – 1978. – P. 43-50.
11. Lazar, M.D. Combining abilities and heritability of callus formation and plantley regeneration in wheat (Triticum aestivum) anther culture /M.D. Lazar //Theor. Appl. Genet., – 1984. – V.68. – P.131-134.