УДК 573.6

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ОЗИМОГО РАПСА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**Чернобровкина М.А., Хватков П.А., Леонтьева А.В., Долгов С.В.***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, e-mail: iab.ac.ru*

Проведена оптимизация условий индукции каллусогенеза и регенерации побегов озимого рапса сорта Северянин из гипокотилей 14-дневных проростков. Учитывались следующие параметры культивирования растений в условиях *in vitro*: эффективность стерилизации, обеспечивающая наибольший выход стерильного материала при наименьшей его гибели, влияние типа экспланта и комбинаций регуляторов роста на каллусогенез, пролиферацию и регенерацию растений. Эффективность каллусогенеза составила от 65 до 100% на всех экспериментальных средах. Наибольшая эффективность пролиферации каллусной культуры отмечена при культивировании эксплантов из нижней части гипокотыля на среде с добавлением 0,1 мг/л альфа-нафтилуксусной кислоты + 2 мг/л бензиладенина, однако определяющим фактором морфогенетического потенциала является эффективность регенерации побегов, а она в этом варианте была низкой (10%). При культивировании эксплантов на иницирующей среде, содержащей 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, с последующим пассажем на среду с добавлением 4 мг/л бензиладенина + 2 мг/л зеатина эффективность регенерации побегов была максимальной (49,3%) в варианте с использованием нижней части гипокотыля. Наиболее высокая эффективность регенерации отмечена при культивировании эксплантов на среде с добавлением 0,1 мг/л альфа-нафтилуксусной кислоты и 0,3 мг/л тидиазуона (81,8%).

Ключевые слова: озимый рапс, культура тканей *in vitro*, каллусогенез, регенерация растений, регуляторы роста

STUDY OF THE DOMESTIC BREEDING WINTER RAPE MORPHOGENETIC POTENTIAL USING IN VITRO CULTURE**Chernobrovkina M.A., Khvatkov P.A., Leonteva A.V., Dolgov S.V.***All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, e-mail: iab.ac.ru*

Optimization of induction conditions for Russian winter rapeseed (cv Severyanin) callusogenesis and shoot regeneration from hypocotyls of 14-day-old seedlings was carried out. The following parameters of plant cultivation under *in vitro* conditions were taken into account: sterilization efficiency, which provides the highest yield of sterile material with the lowest mortality, the effect of explant type and growth regulators combinations on callusogenesis, proliferation and regeneration of plants. The efficiency of callusogenesis was about 65–100% among all experimental media. The highest efficiency of callus culture proliferation was observed during the cultivation of explants from the lowest part of hypocotyl on the medium supplemented with 0.1 mg / l of alpha-naphthylacetic acid + 2 mg / l of benzyladenine. Since the determining factor of the morphogenetic potential is the regeneration efficiency of shoots, this variant was considered unsuitable because of the lack of regeneration (10%). The efficiency of shoot regeneration at 49.3% was achieved if the explants from the lowest part of hypocotyl were initially cultivated on the medium supplemented with 1 mg / l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and subsequently transferred onto the medium containing 4 mg / l benzyladenin + 2 mg / l zeatin. The highest regeneration efficiency (81.8%) was observed when the explants were cultivated on the medium supplemented with 0.1 mg / l of alpha-naphthylacetic acid and 0.3 mg / l thidiazuron.

Keywords: winter rapeseed, tissue culture *in vitro*, callusogenesis, plant regeneration, growth regulators

Методы селекции направлены на улучшение старых и создание новых сортов культурных растений с более ярко выраженными хозяйственно ценными признаками, такими как высокая урожайность, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам. В этом направлении биотехнология, и в частности геновая инженерия, становится «помощником» традиционной селекции, так как позволяет вводить в геном растения чужеродные гены, отвечающие за полезные качества. При использовании методов биоинженерии необходимо проводить исследования морфогенного потенциала и регенерационной способности для каждого нового целевого генотипа растения.

Рапс озимый (*Brassica napus*) принадлежит к семейству Brassicaceae и является ценным растением, возделываемым для получения масла пищевого или технического назначения.

Растения данного семейства являются довольно хорошо изученными для применения методов биотехнологии. Работы по введению *Brassica napus* в культуру *in vitro* начались приблизительно с 70-х годов прошлого века. За это время были изучены различные факторы, влияющие на каллусогенез и регенерацию растений *in vitro*, такие как возраст, размер и тип экспланта, генотип растения, состав питательной среды, эффект различных экзогенных регуляторов роста [1–5], однако все эти исследования ве-

лись с использованием сортов рапса ярового типа [6, 7]. Относительно озимого рапса имеются лишь единичные сообщения [8–10]. Известно, что регенерация растений сильно зависит от специфичности генотипа [11], поэтому необходимо разработать надежный и воспроизводимый протокол регенерации для определенного генотипа или сорта. Целью данной работы являлось изучение морфогенного потенциала и регенерационной способности озимого рапса отечественной селекции, который является перспективным объектом для дальнейшей трансформации и селекции [11, 12].

Материалы и методы исследования

Растительный материал. В качестве объекта исследования был использован сорт озимого рапса (*Brassica napus*) Северянин отечественной селекции (ФГБНУ «ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса»). Сорт двулузевой, допущен к возделыванию в Центральном и Центрально-Черноземном регионах. В масле практически отсутствует эруковая кислота и глюкозинолаты. Коммерческая ценность данного сорта состоит в высокой семенной и кормовой продуктивности, качестве масла и шрота, устойчивости к основным болезням, технологичности возделывания и уборки, высокой зимостойкости относительно других сортов озимого рапса отечественной селекции.

Питательные среды. Для проращивания семян в стерильных условиях использовали агаризованную среду Мурасиге – Скуга (MS), содержащую половинную концентрацию макроэлементов. Для изучения регенерационной способности растений озимого рапса использовали среду MS с добавлением микроэлементов, витаминов и регуляторов роста в различных концентрациях и комбинациях в шести вариантах, подобранных согласно данным литературных источников.

Получение донорных растений в асептических условиях. Для получения растительного материала использовали стерильные донорные растения, полученные в асептических условиях. Для этого первоначально отбирали наиболее крупные семена рапса, затем их стерилизовали в водном растворе коммерческого препарата «Белизна» различной концентрации (от 15 до 50%) и временной экспозиции (от 10 до 35 минут). После этого семена пятикратно промывали дистиллированной водой. Семена в количестве 25 штук помещали в стерильные культуральные емкости, заполненные средой MS, не содержащей экзогенных регуляторов роста, и культивировали при температуре 23–25°C, интенсивности освещения 65 mol m⁻² s⁻¹ и фотопериоде 16/8 часов (день/ночь) в световом модуле Лаборатории генной инженерии растений ВНИИСБ.

Подготовка эксплантов и их культивирование. При достижении донорными растениями 12–14-дневного возраста их подвергали сегментированию в асептических условиях. В экспериментах по регенерации в качестве эксплантов использовали сегменты длиной около 7 мм из верхней, средней и нижней частей гипокотили, которые помещали на чашки Петри диаметром 90 мм, заполненные 20–25 мл агаризованной питательной среды MS с добавлением регуляторов роста в различных комбинациях. На одну чашку Петри располагали 15 штук эксплантов, эксперименты проводили в трехкратной повторности для каждого варианта.

Каллусогенез и регенерация. В экспериментах по индукции каллусогенеза использовали 6 вариантов состава питательных сред, различающихся по содержанию фитогормонов и регуляторов роста.

Для роста образовавшихся побегов использовали среду MS, содержащую регуляторы роста в пониженных концентрациях. Каждые 3 недели экспланты пассировали на свежие среды.

В экспериментах были использованы следующие концентрации и комбинации регуляторов роста:

1. 1 мг/л 2,4-Д (первый пассаж), далее 4 мг/л 6-БАП + 2 мг/л Зеатин.
2. 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л 6-БАП (первый пассаж), далее 1 мг/л 6-БАП.
3. 0,1 мг/л НУК + 1 мг/л 6-БАП (первый пассаж), далее 0,1 мг/л НУК + 1 мг/л 6-БАП.
4. 0,1 мг/л НУК + 2 мг/л 6-БАП (первый пассаж), далее 0,1 мг/л НУК + 2 мг/л 6-БАП.
5. 0,05 мг/л НУК + 0,3 мг/л ТДЗ (первый пассаж), далее 0,3 мг/л ТДЗ + 0,1 мг/л НУК.
6. 0,05 мг/л НУК + 0,1 мг/л ТДЗ (первый пассаж), далее 0,1 мг/л ТДЗ + 0,1 мг/л НУК.

В ходе эксперимента учитывали три показателя эффективности влияния регуляторов роста на процессы морфогенеза у эксплантов:

1. Эффективность каллусогенеза (выражали в процентах путем деления количества эксплантов, образовавших каллус, на общее количество эксплантов в каждом варианте).
2. Интенсивность пролиферации эксплантов (выражали кратностью увеличения объема экспланта путем деления начального объема сегмента гипокотили на объем образовавшегося каллуса в каждом варианте).
3. Эффективность регенерации из эксплантов (выражали в процентах путем деления количества эксплантов, образовавших побеги, на общее количество эксплантов в каждом варианте).

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением частных средних и оценки их по критерию Дункана.

Результаты исследования и их обсуждение

Для получения донорных растений при последующей работе в условиях *in vitro* необходимо разработать методику эффективной стерилизации, обеспечивающую наибольший выход стерильного материала при наименьшей его гибели. Наибольший выход стерильного материала при наименьшей гибели растений был достигнут при выдерживании семян в 25% водном растворе коммерческого препарата «Белизна» в течение 20 минут. При менее длительной экспозиции наблюдалось бактериальное и грибное заражение проростков. При более длительной экспозиции наблюдался значительный процент гибели растительного материала.

Известно, что тип экспланта и экзогенные регуляторы роста оказывают большое воздействие на частоту регенерации при использовании различных методов культивирования тканей. Для исследования мор-

фогенного потенциала генотипа и разработки системы эффективной и стабильной регенерации целых растений было изучено влияние типа экспланта и комбинаций регу-

ляторов роста на каллусогенез, пролиферацию и регенерацию растений. Комбинации регуляторов роста были подобраны согласно литературным источникам.

А

Б

В

Рис. 1. Каллусогенез у гипокотилей рапса при использовании различных регуляторов роста: А – НУК + 6-БАП (вар. 4), Б – НУК + ТДЗ (вар. 5), В – 2,4-Д (вар. 1)

Таблица 1

Влияние различных комбинаций регуляторов роста на каллусогенез, интенсивность пролиферации и эффективность регенерации озимого рапса

Сегмент гипокотилия	Показатель	Вариант состава среды						Средние
		1	2	3	4	5	6	
Верхний	Каллусогенез (%)	96	100	100	65	100	100	93,5
	Интенсивность пролиферации (раз)	92,67ab	168,99ijk	148,19ghi	123,03cdefg	167,84hijk	112,07bcd	133,78
	Регенерация (%)	22,00abcd	0	18,00abc	0	32,00bcd	7,00ab	13,17
Средний	Каллусогенез (%)	98	99	97	80	100	100	95,67
	Интенсивность пролиферации (раз)	104,09abc	140,32ghi	139,79fg	143,36ghi	146,30ghi	102,56abc	130,4
	Регенерация (%)	40,00cd	0	2,33a	0	0	1,75a	7,48
Нижний	Каллусогенез (%)	100	99	97	80	99	100	95,83
	Интенсивность пролиферации (раз)	85,11a	137,11efg	132,79defg	180,97k	176,28jk	110,60abcd	131,81
	Регенерация (%)	49,33d	2,00a	0	10,00ab	0	0	10,22
Средние	По каллусогенезу (%)	98	99,33	98	75	99,67	100	
	По интенсивности пролиферации (раз)	94,37a	148,13c	139,67bc	149,12c	156,56c	104,11a	
	По регенерации (%)	37,43b	2,71a	11,30a	6,15a	11,48a	7,65a	

Примечание. (a–k) – достоверно различающиеся кластеры данных согласно оценке множественных средних по критерию Дункана.

Для двудольных растений и, в частности, семейства Brassicaceae наиболее эффективным регулятором роста для образования каллуса являются цитокинины, преимущественное использование имеет бензиладенин. Регулятор роста тидиазурон (замещенная фенилмочевина (N-фенил N'-1,2,3-тиадиазол-5-илмочевина) не относится к цитокининам, но по характеру воздействия на процессы каллусообразования схож с таковыми. Такой регулятор роста, как 2,4-Д, относится к ауксиновому типу и используется для инициации каллусогенеза у однодольных растений, однако есть сведения, что он может быть в некоторых случаях применен и для двудольных растений [1].

Для инициации каллусообразования в наших исследованиях были использованы цитокинины (бензиладенин 6-БАП), ауксины [2,4-Д, альфа-нафтилуксусная кислота (НУК)], а также тидиазурон (ТДЗ).

Эффективность каллусогенеза составляла порядка 100% во всех вариантах проведенных нами опытов. Наиболее высокая пролиферативная активность, согласно ана-

лизу частных средних, была отмечена на среде, содержащей 0,1 мг/л НУК в сочетании с 1 мг/л 6-БАП (рис. 1, А), а по общим – в варианте сочетания ТДЗ и НУК в концентрациях 0,3 мг/л и 0,1 мг/л (рис. 1, Б, табл. 1).

Использование 1 мг/л 2,4-Д в первом пассаже с последующей пересадкой на среду, содержащую 4 мг/л 6-БАП + 2 мг/л зеатина, обеспечило наиболее высокий процент регенерации побегов (49,3%) при использовании эксплантов из нижней части гипокотилия (рис. 2, В). Несколько меньшая регенерационная способность наблюдалась в варианте с использованием верхней части гипокотилия при добавлении ТДЗ в концентрации 0,3 мг/л (табл. 1). Однако, согласно литературным данным, использование ТДЗ значительно повышает регенерационную способность эксплантов, в связи с этим было осуществлено более детальное изучение влияния различных концентраций ТДЗ (в сочетании с 0,1 мг/л НУК) на регенерацию рапса (табл. 2). В данном исследовании использовали среднюю часть гипокотилия.

Рис. 2. Образование побегов рапса из каллусов при использовании различных регуляторов роста: А – НУК + 6-БАП (вар. 4), Б – НУК + ТДЗ (вар. 3), В – 2,4-Д (вар. 1)

Таблица 2

Влияние различных концентраций тидиазурина на регенерацию озимого рапса

Концентрация ТДЗ, мг/л	Эффективность регенерации, %
0,15	33,9bc
0,3	81,8d
0,45	63,9cd
0,6	23,2ab
0,75	3,3a

Примечание. (a-d) – достоверно различающиеся кластеры данных согласно оценке множественных средних по критерию Дункана.

Анализ данных, приведенных в табл. 2, свидетельствует о том, что наиболее высокую регенерационную способность (81,8%) продемонстрировали экспланты, культивируемые на среде с добавлением 0,3 мг/л ТДЗ и 0,1 мг/л НУК. Регенерация растений в данном варианте практически в 2 раза превысила таковую при использовании первого варианта.

Заключение

Анализ морфогенетического потенциала озимого рапса сорта Северянин показал, что эффективность каллусогенеза при использовании эксплантов, полученных от гипокотилей 14-дневных проростков в культуре *in vitro*, составляет от 65 до 100% на всех экспериментальных средах, изученных в процессе исследования. Наибольшая интенсивность пролиферации каллусной культуры отмечена при культивировании эксплантов из нижней части гипокотилия на среде с добавлением 0,1 мг/л НУК + 2 мг/л 6-БАП, однако определяющим фактором морфогенетического потенциала является эффективность регенерации побегов, а она в этом варианте была низкой (10%). При культивировании эксплантов на иницирующей среде, содержащей 1 мг/л 2,4-Д, с последующим пассажем на среду с добавлением 4 мг/л 6-БАП + 2 мг/л зеатина эффективность регенерации побегов была максимальной и в варианте с использованием нижней части гипокотилия составила 49,3%. Наиболее высокая эффективность регенерации отмечена при культивировании эксплантов на среде с добавлением 0,1 мг/л НУК и 0,3 мг/л ТДЗ (81,8%).

Исследования проведены в рамках выполнения ГЗ (0574-2014-0024) № госрегистрации АААА-А17-117082950004-9.

Список литературы

1. Cardoza V., Stewart N.C. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2004. – vol. 40, № 6. – P. 542–551.
2. Ravanfar S.A., Aziz M.A., Rashid A.A., Salim S. In vitro adventitious shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica oleracea* subsp. *italica* and *Brassica oleracea* subsp. *capitata* using TDZ and NAA // *Pak. J. Bot.* – 2014. – vol. 46, № 1. – P. 329–335.
3. Ravanfar S.A., Aziz M.A., Kadir M.A., Rashid A.A., Sirchi M.H.T. Plant regeneration of *Brassica oleracea* subsp. *italica* (broccoli) cv Green Marvel as affected by plant growth regulators // *African Journal of Biotechnology.* – 2009. – vol. 8, № 11. – P. 2523–2528.
4. Zeynali M. Influence of genotype and plant growth regulator on somatic embryogenesis in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *African Journal of Biotechnology.* – 2010. – vol. 9, № 26. – P. 4050–4055.
5. Gerszberg A., Hnatuszko-Konk K., Kowalczyk T. In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *capitata* // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2015. – vol. 51, № 1. – P. 80–87.
6. Pavlovic S., Vinterhalter B., Mitic N., Adzic S., Pavlovic N., Zdravkovic M., Vinterhalter D. In vitro shoot regeneration from seedling explants in *Brassica* vegetables: red cabbage, broccoli, savoy cabbage and cauliflower // *Arch. Biol. Sci.* – 2010. – vol. 62. – P. 337–3456.
7. Burbulis N., Blinstrubiene A., Kupriene R., Jonytiene V., Rugienius R., Staniene G. In vitro regeneration of *Brassica napus* L. shoots from hypocotyls and stem segments // *Zemdirbyste-Agri.* – 2009. – vol. 96, № 3. – P. 176–185.
8. Ivashuta S.I., Mazin V.V. Regeneration of winter rape in vitro for genetic transformation // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 1994. – vol. 41, № 3. – P. 388–390.
9. Turczynowska A., Siatkowski I., Broda Z. Analysis of genetic components of winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) regeneration ability under in vitro culture // *BioTechnologia.* – 2015. – vol. 96, № 1. – P. 30–35.
10. Леонтьева А.В. Изучение условий регенерации *in vitro* и агробактериальной трансформации озимого рапса при получении растений с повышенной холодостойкостью / Леонтьева А.В., Чернобровкина М.А., Хватков П.А., Долгов С.В. // XV Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 8 апреля, 2015 г.) – М., 2015. – С. 5–6.
11. Sretenovic-Rajicic T., Ninkovic S., Uzelac B., Vinterhalter B., Vinterhalter D. Effects of plant genotype and bacterial strain on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* // *Russ J. Plant Physiol.* – 2007. – vol. 54, № 5. – P. 653–658.
12. Maheshwari P., Selvaraj G., Kovalchuk I. Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – vol. 29, № 1. – P. 144–155.