

**СОЗДАНИЕ НОВОГО ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ОЗИМОГО РАПСА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ,
МУТАГЕНЕЗА И КУЛЬТУРЫ *IN VITRO***

**Я.Э. Пилюк, Е.Н. Куликович, канд. с.-х. наук, С.Ю., Храмченко,
И.Н. Синеца, О.Н. Авхимович, научные сотрудники**

*РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
(Поступила 30.03.2021)*

Рецензент: Гордей С.И., кандидат биол. наук

Аннотация. В статье представлены результаты исследований по созданию нового исходного материала для селекции озимого рапса с использованием межвидовой гибридизации, мутагенеза и культуры *in vitro*. Установлено, что межвидовые гибриды рапса имеют меньшую эмбриогенную и регенерационную способность, чем внутривидовые формы этой культуры, однако с использованием культуры *in vitro* можно ускорить на 3-4 года или на 30-33 % создание нового исходного материала для селекции сортов и гибридов озимого рапса. Показано, что среди основных факторов повышения эффективности метода андрогенеза *in vitro* рапса большое значение имеет генотипическая специфичность исходного материала, наличие в пыльниках пыльцы в стадии одноядерных или двухъядерных микроспор, а также сроки отбора и способы предобработки донорного материала.

Основой любой селекционной программы является расширение диапазона генетической изменчивости с целью отбора желаемых признаков для создания сортов сельскохозяйственных культур. В селекции рапса активно используются такие методы, как беккроссы, рекуррентный отбор, инбридинг, получение ди-гаплоидов методом культуры пыльников и микроспор и др. [3, 9]. Немаловажную роль в селекции рапса играет отдаленная гибридизация, так как перенос ценных генов из других видов и родов *Brassicaceae* расширяет его генетический потенциал, который еще не велик. Этот метод широко применяют в Канаде, Германии, США и др. странах. Для этих целей рапс скрещивают с различными видами капусты, сурепицей, горчицей черной и сарептской и другими видами рода *Brassica* [1, 12]. При проведении отдаленной гибридизации селекционеру постоянно приходится сталкиваться с тремя основными проблемами: нескрещиваемость генетически отдаленных видов, несовместимость гибридных семян, бесплодие полученных гибридов. Для преодоления нескрещиваемости подобранных пар видов для гибридизации рода *Brassica* в селекционной практике используются мичуринские методы смеси пыльцы, метод посредника, реци-прокных скрещиваний, нанесения биостимуляторов на рыльце пестика и др. Однако лишь ограниченное число межвидовых и межродовых скрещиваний в

семействе *Brassicaceae* может привести к получению полноценных гибридных растений [5]. Использование методов клеточной и тканевой биотехнологии в селекции облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс создания новых форм и сортов растений. Широкое применение в сельскохозяйственной биотехнологии нашел метод индуцирования гаплоидии в культуре репродуктивных органов. Главными преимуществами метода являются быстрое достижение гомозиготности у линий и возможность отбора рекомбинантных генотипов (несущих желаемые признаки) на ранних этапах селекционного процесса [10]. Впервые гаплоидные растения и каллус из культивируемых *in vitro* пыльников рода *Brassica* были получены и описаны для *Brassica oleracea*. Позже появилась информация о проведении аналогичных работ с *B. campestris*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. juncea* и многих других видов *Brassica* [4].

Значение отдаленной гибридизации в создании нового исходного материала рапса особенно велико на современном этапе селекционной работы (изменение климата, расширение зон возделывания, значительный рост посевных площадей), когда для селекционеров по этой культуре требуется более разнообразный и гомозиготный исходный материал с целью ускорения селекционного процесса на 3-4 года.

Целью наших исследований являлось создание нового исходного материала для селекции озимого рапса с использованием межвидовой гибридизации, мутагенеза и культуры *in vitro*.

Материал и методика исследований. Исследования проводили в 2017-2019 гг. на опытных полях РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» в Смолевичском районе Минской области и в фитотронно-тепличном комплексе (ФТК). Технология возделывания озимого рапса на маслосемена – общепринятая для данной зоны [8]. Закладку опытов, фенологические наблюдения, полевые и лабораторные учеты и структурный анализ растений проводили согласно методике Государственного испытания [6], методике ВИР [7] и методике полевого опыта Б.А. Доспехова [2].

Объектом исследований служили сорта, сортообразцы, линии, гибриды озимого рапса и элементарные виды рода *Brassica* (капуста: пекинская, китайская, кормовая; озимая и яровая сурепица, горчица черная и сарептская и др.), различающиеся по качеству, устойчивости к болезням, зимостойкости, длине вегетационного периода и т.п. Гибридизацию проводили по общепринятой для рапса методике [11]. Для гистологических исследований пыльники отбирались поочередно во время трех фаз бутонизации: а) с очень маленьким бутонем – до 2 мм; б) бутон средний – 3-4 мм; в) только что распускающийся бутон. Для отбора пыльников донорные растения выращивали в камере искусственного климата при 16-часовом фотопериоде при температуре +10 °С день/ +5 °С ночь.

Для использования в культуре пыльников *in vitro* рапса отбор бутонов проводили на ранней одноядерной стадии развития микроспор, как наиболее оптимальной. Изолированные бутоны подвергали воздействию холодной предобработки при +2...+4 °С, а также индуцирующих фитогормонов. Пыльники пассивировали на питательную среду Келлера-Армстронга с различными модифика-

циями. Культивирование пыльников проводили в термостате при отсутствии освещения при температуре +35 °С (2-3 дня), а затем при +25 °С (3-4 недели) до появления эмбриоидов. Эмбриоиды пересаживали на модифицированную среду Мурасиге-Скуга для регенерации. Гаплоидные регенеранты в фазе 2-3 листьев подвергали дигаплоидизации путем воздействия водным раствором колхицина на корневую систему с последующим промыванием проточной водой. Дигаплоидные растения высаживали в искусственную почву для доращивания и далее – в теплицу или поле.

Для повышения количества рекомбинантов с новыми комбинациями признаков проводилась обработка межвидовых гибридов раствором для сенсбилизации с последующим облучением в УФ установке. Для этого проводили частичное погружение зародышей полученных межвидовых гибридов на стадии 2-3-х листочков в сенсбилизующий раствор на 24 часа. В состав раствора входил аминоурацил, стрептоцид, фолиевая кислота, хлорамфеникол, ДМСО и 5-бромурацил. После обработки раствором растения промывали в проточной воде и затем облучали на установке для УФ. Режим облучения на УФ-установке заключался в трех этапах жесткого облучения по 20 минут с перерывами в 30 мин. Общее время облучения составляло 8-10 часов. После мутагенной обработки проростки высаживали в искусственную почву для акклиматизации. Акклиматизация проводилась в течение 1 месяца, затем выжившие растения высаживали в сосуды в ФТК. В процессе обработки и акклиматизации наблюдалась гибель растений на всех этапах эксперимента.

Метеорологические условия в период исследований отличались от средне-многолетних показателей, особенно по количеству атмосферных осадков, но в целом складывались благоприятно для роста и развития крестоцветных культур.

Результаты исследований и их обсуждение. Отдаленная гибридизация видов рода *Brassica* с применением биотехнологических методов (культуры органов и тканей) является одним из важнейших подходов в создании нового исходного материала, а также сортов и гибридов рапса с новыми признаками.

Для изучения на какой стадии развития находятся пыльцевые зерна у озимого рапса в зависимости от размеров бутона и для выявления стадии одноядерных микроспор были проведены гистологические исследования пыльников. На рисунке 1 представлены разрезы пыльников сорта озимого рапса *Оникс* в период, когда длина бутонов находилась в состоянии до 2 мм (а), при размере 3-4 мм (б) и в период начала их раскрытия (в).

Из представленных данных видно, что пыльники в бутонах до 2 мм в длину (а) слабо развиты и не полностью дифференцированы, пыльцевые зерна в этот период еще не сформировались до типичных размеров. На стадии развития бутонов 3-4 мм (б) уже произошла дифференциация тканей пыльника и содержимого пыльцевого мешка. Пыльцевые зерна находились на стадии одно- или двухядерных микроспор. Начало этого периода наиболее благоприятно для отбора пыльников и микроспор, а окончание для кастрации цветков рапса. На третьем снимке видно (в), что при распускании бутонов пыльца уже зрелая, но

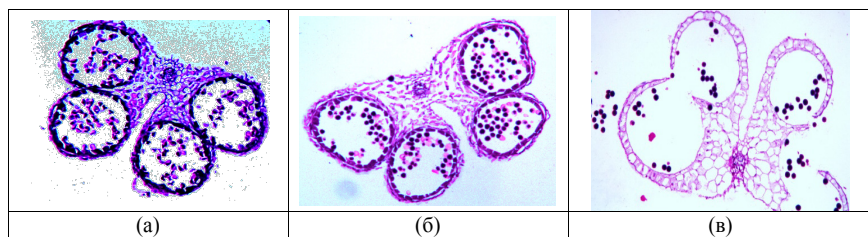


Рисунок 1 - Разрезы пыльников сорта озимого рапса (при 100 кратном увеличении) при длине бутонов: (а) - до 2 мм, (б) – 3-4 мм, (в) – в период его раскрытия

характеризуется низкой эмбриогенной и регенерационной способностью. Этот период не приемлем для гибридизации рапса, в силу того, что пыльники, раскрывая бутон, как правило, лопаются, и в этот момент происходит опыление пестика своего цветка, т.е. самоопыление (рисунок 1в).

С целью стимулирования роста эмбриоидов из незрелых пыльцевых зерен, находящихся внутри пыльников, в питательную среду добавлялись ауксины и цитокинины в различных концентрациях. В качестве донорного материала для извлечения эксплантов использовали 15 образцов озимого рапса. В каждую пробирку было высажено по 18 пыльников, полученных из 3 бутонов. Общее количество высаженных пыльников составило 10512 штук, эксплантированных в 584 пробирках (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты эксплантирования пыльников межвидовых гибридов озимого рапса на искусственные питательные среды при оптимальных размерах бутонов

Образец	Количество эксплантированных пыльников, шт.	Количество полученных эмбриоидов, шт.	Выход эмбриоидов, %
C ₁₉ № 90 16/15 _T – 32y	468	7	1,4
C ₇ № 14 95/11 – 1p-M	702	10	1,4
C ₁₉ № 53 16/15 _T – 23y	1422	49	3,5
C ₂₂ № 62 16/15 _T – 38y	1224	47	3,8
C ₁₂ № 25 16/15 _T – 2y	666	6	0,9
C ₃ № 6 221/17 (1+2)	648	8	1,2
C ₂₁ № 58 16/15 _T – 43y	1188	45	3,8
C ₃ № 6 221/17 (1+2)	720	22	3,1
C ₂₅ № 72 35/18	450	15	3,3
C ₂₂ № 72 35/18	198	3	1,5
C ₆ № 12 Kp/11p-1p-M	864	29	3,4
C ₇ № 14 95/11 – 1p-M	756	25	3,3
C ₁₉ № 50 16/15 _T – 32y	540	11	2,0
C ₁₂ № 25 16/15 _T – 2y	450	15	3,3
C ₁₉ № 50 16/15 _T – 32y	306	2	0,7
Итого	10602	294	2,8

В нашем опыте максимальное количество незрелых пыльников было выделено у образцов C_{19} № 53 16/15_m – 23у; C_{22} № 62 16/15_m – 38у; C_{21} № 58 16/15_m – 43у (таблица 1).

Выход эмбриоидов наблюдался у всех изученных образцов, однако он был невысоким. Максимальные значения по данному показателю отмечены у C_{21} № 58 16/15_m – 43у (3,8%), C_{22} № 62 16/15_m – 38у (3,8%) и C_{19} № 53 16/15_m – 23у (3,5 %), т.е. у образцов с максимальным выходом эксплантированных пыльников.

Получение гаплоидов в культуре *in vitro* требует абсолютной асептики, что сопряжено с рядом трудностей при использовании этого метода. В таблице 2 и на рисунке 2 представлены результаты изучения эмбриогенной и регенерационной способности пыльников у различных по происхождению образцов озимого рапса.

Таблица 2 – Результаты изучения эмбриогенной и регенерационной способности пыльников у различных образцов озимого рапса

№ образца	Количество использованных цветков, шт.	Количество высаженных пыльников, шт.	Количество полученных эмбриоидов, шт.	Выход эмбриоидов, %	Выход регенерантов, шт.	Уровень регенерации, %
1	57	342	2	0,58	-	-
2	42	252	-	-	-	-
3	63	378	-	-	-	-
4	99	594	1	0,17	1	100
5	153	918	75	8,17	13	17,3
6	168	1008	82	8,13	19	23,2
7	132	792	5	0,63	-	-
8	231	1386	-	-	-	-
9	126	756	-	-	-	-
10	84	504	5	0,99	2	40
11	168	1008	239	23,7	54	22,6

Самый высокий процент полученных эмбриоидов отмечен у образца №11 – 23,7%. Неплохими показателями данного признака характеризовались образцы № №5, 6 – 8,17 и 8,13 % соответственно. У образцов №2, №3, №8 и №9 эмбриоиды полностью отсутствовали. Что касается такого показателя, как процент регенерации полноценных растений из эмбриоидов, то он изменялся от 17,3 % у №5 до 100 % у №4, при высоком уровне дигаплоидизации от 15 до 50 %.

Результаты изучения эмбриогенной и регенерационной способности пыльников у различных межвидовых гибридов озимого рапса представлены в таблице 3. Из приведенных данных видно, что эмбриогенная способность полученных межвидовых гибридов значительно ниже, чем у исходных образцов озимого рапса. Отмечено, что у озимых форм межвидовых гибридов максимальный выход эмбриоидов и дигаплоидов был у образцов №72 и №Z6.

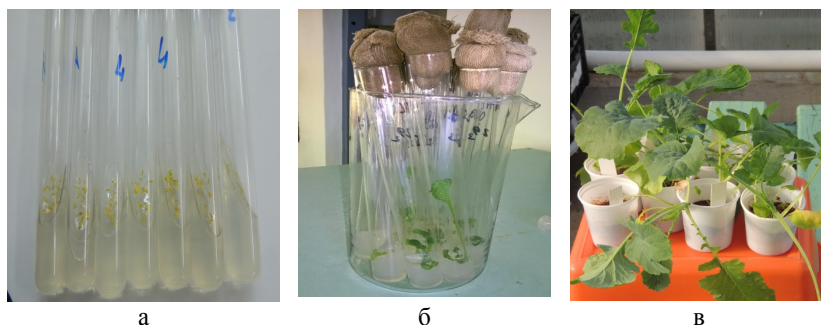


Рисунок 2 – Получение рапса с использованием культуры пыльников *in vitro*: а) посадка пыльников гибридов рапса на искусственную питательную среду Келлера-Армстронга для инициации эмбриогенеза; б) регенеранты растений гибридов рапса на питательной модифицированной среде Мурасиге-Скуга; в) дигамплоидные растения гибридов рапса полученные в культуре пыльников *in vitro*.

Таблица 3 – Изучение эмбрионной и регенерационной способности пыльников у межвидовых гибридов озимого рапса

Межвидовой гибрид	Количество высаженных пыльников, шт.	Количество полу- ченных эмбрио- идов		Количество полу- ченных регенера- нтов		Количество полу- ченных дигамплои- дов	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
№N69	66	-	-	-	-	-	-
№N61	84	1	1,2	-	-	-	-
№N72	138	3	2,2	2	66,7	2	100
№M17	60	-	-	-	-	-	-
№Z10	12	-	-	-	-	-	-
№Z5	84	3	3,6	3	100	1	33,3
№Z9	36	-	-	-	-	-	-
№Z6	36	1	2,8	1	100	1	100
№Z12	36	-	-	-	-	-	-

Таким образом, среди основных факторов повышения эффективности метода андрогенеза *in vitro* рапса большое значение имеет генотипическая специфичность исходного материала, наличие в пыльниках пыльцы в стадии одноядерных или двухъядерных микроспор, сроки отбора и способы предобработки донорного материала. Использование культуры *in vitro* позволило сократить сроки создания генетически разнообразного и одновременно константного исходного материала для селекции сортов и гибридов озимого рапса и получить 37 образцов и свыше 150 мутарекомбинантов. Гомозиготные линии будут использованы для создания новых сортов и гетерозисных гибридов F₁ озимого рапса с улучшенными морфологическими и селекционно-ценными признаками.

Образцы озимого рапса, их внутривидовые и межвидовые гибриды с элементарными видами рода *Brassica* (капусты: пекинская, китайская, кормовая, озимая и яровая сурепица, горчица сарептская и др.), высевались в условиях ФТК. По мере наступления соответствующих фаз развития растения проходили яровизацию, межвидовую гибридизацию и по многим из них получено семенное потомство. Фенологические наблюдения за опытными растениями и учеты в условиях фитотрона показали, что отдаленные гибриды крестоцветных культур отличались от традиционных сортов и гибридов по окраске растений, интенсивности воскового налета, гофрированности, зазубренности, форме листьев и другим морфологическим признакам (рисунок 3).



Рисунок 3 – Размножение образцов озимого рапса, созданных методом отдаленной гибридизации (озимый рапс × пекинская капуста) в ФТК

С использованием культуры *in vitro* получены скороспелые сортообразцы озимого рапса, созданные по комбинациям: озимый рапс × (яровой рапс × пекинская капуста) – (№16/15т); озимый рапс × озимая сурепица – (№44/15т и №7/15т) и др., которые обладают новыми утилитарными признаками, а образец №16/15т отличается скороспелостью, урожайностью, качеством, повышенной устойчивостью к болезням листьев, стеблей и стручков (рисунок 4).



Рисунок 4 – Скороспелый сортообразец озимого рапса (№16/15т), созданный по комбинации озимый рапс × (яровой рапс × пекинская капуста) и размножение его линий, обработанных на УФО установке

Семена образца озимого рапса №16/15т были подвержены ультрафиолетовому облучению на УФО установке, рассада выращивалась в условиях ФТК с последующей высадкой в поле для дальнейшего использования в селекционном процессе. Образцы существенно отличались между собой по продолжительности фенологических фаз развития, высоте растений, семенной продуктивности, устойчивости к болезням (рисунок 4).

Выводы

1. Бутоны озимого рапса менее 2 мм не пригодны для культуры пыльников *in vitro*, оптимальным размером, наиболее благоприятным для отбора пыльников и микроспор, будет 3-3,5 мм, а размеры бутонов 3,5-4 мм оптимальны для кастрации цветков рапса. Стадия распускания бутонов («желтый бутон») не годится для отбора пыльников и микроспор, а также кастрации цветков рапса, в этот период происходит опыление пестика своего цветка, т.е. самоопыление.

2. Межвидовые гибриды рапса имеют меньшую эмбриогенную и регенерационную способность, чем исходные формы этой культуры, однако с использованием культуры *in vitro* можно ускорить на 3-4 года или на 30-33 % создание нового исходного материала для селекции сортов и гибридов озимого рапса.

3. С использованием методов межвидовой гибридизации, мутарекомбиногенеза и культуры *in vitro* созданы межвидовые гибриды F₁ озимого рапса, получены регенеранты, растения и семенной материал рапса, отличающийся скороспелостью, низкорослостью, устойчивостью к болезням и другими селекционно-ценными признаками.

Литература

1. Бархатенкова, Л.А. Генетические ресурсы и эффективные методы создания нового селекционного материала сельскохозяйственных растений / Л.А. Бархатенкова. – Новосибирск, 1994. – 105 с.
2. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов /. – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
3. Карпачев, В.В. Рапс яровой / В.В. Карпачев // Основы селекции: моногр. / Всерос. науч.-исслед. и проектно-технол. ин-т рапса. – Липецк, 2008. – С. 53-60.
4. Котлярова, Е.Б. Аспекты применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.): дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05. – Липецк, 2007. – 128 с.
5. Котлярова, Е.Б. Применение методов *in vitro* для получения межвидовых и межродовых гибридов растений семейства *Brassicaceae* (Обзор) / Е.Б. Котлярова, Е.Н. Жидкова, О.А. Подвигина // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – № 2. – С. 64-70.
6. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / под ред. М. А. Федина. – М., 1988. – 121 с.
7. Методические указаниями по изучению мировой коллекции масличных культур / ВИР – СПб., 1976. – 23 с.
8. Организационно-технологические нормативы возделывания кормовых и технических культур: сборник отраслевых регламентов / Национальная академия наук Беларуси, Научно-

практический центр НАН Беларуси по земледелию; рук. разработ.: Ф.И. Привалов [и др.]; под общ. ред. В.Г. Гусакова, Ф.И. Привалова. – Минск: Беларус. навука, 2012. – С. 380-396.

9. Пилук, Я.Э. Рапс в Беларуси: (биология, селекция и технология возделывания) / Я.Э. Пилук – Минск: Бизнесофсет, 2007. – 239 с.

10. Рахимбаев, И.Р. Экспериментальная гаплоидия в культуре пыльников и микроспор зерновых злаков (обзор) / И.Р. Рахимбаев, Ш. Тивари, Б.Р. Кударов // Сельскохозяйственная биология. – 1990. – № 3. – С. 44-55.

11. Руководство по селекции и семеноводству масличных культур. – М., Колос, 1986. – 204 с.

12. Howell, P.M. Towards developing intervarietal substitution lines in Brassica napus using marker-assisted selection / P.M. Howell [et al.]. – Genome. –1996. – Vol. 39. – P.348-358.

CREATION OF THE NEW INITIAL MATERIAL OF WINTER RAPE WITH THE USE OF INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION, MUTAGENESIS AND IN VITRO CULTURE
Ya.E. Piliuk, E.N. Kulinkovich, S.Yu. Khramchenko, I.N. Sinitsa, O.N. Avhimovich

The paper presents the results of the research on the creation of the new initial material for winter rape breeding with the use of interspecific hybridization, mutagenesis and in vitro culture. It's established that interspecific hybrids of rape have a lower embryogenic and regenerative ability than intraspecific forms of this crop, but with the use of in vitro culture the creation of the new initial material for breeding of winter rape varieties and hybrids can be sped up by 3-4 years or 30-33 %. It is shown that genotypic specificity of the initial material, pollen in anthers at the stage of mononuclear and double nuclear microspores as well as selection dates and ways of pre-treatment of the donor material are of great importance among the key factors of increasing the efficiency of in vitro androgenesis in rape.

УДК 633.853.494 «324»:631[527.5:524.8]

**ПРОЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТА ГЕТЕРОЗИСА И НАСЛЕДОВАНИЕ
ОСНОВНЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ГИБРИДАМИ F₁
ОЗИМОГО РАПСА**

Н.Н. Бобко, Я.Э. Пилук, кандидат с.-х. наук

*Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию
(Поступила 02.04.2021)*

Рецензент: Гордей С.И., кандидат биол. наук

Аннотация. В условиях полевого опыта изучены степень и характер проявления гетерозиса у гибридов F₁ озимого рапса, полученных от скрещивания инбредных линий отечественной селекции. Определен эффект гетерозиса и степень фенотипического доминирования следующих количественных признаков: высоты растения, высоты первого бокового ветвления, длины центральной кисти, числа ветвей первого порядка, числа стручков на центральной кисти, числа семян в стручке, всего стручков на растении, крупности семян, продуктивности одного растения, отобраны перспективные рекомбинанты. Полученные гибридные комбинации и лучшие источники хозяйственно-ценных признаков будут использованы в селекционной работе.