

## Влияние концентрации сахарозы на развитие неоплодотворённых семязачатков ярового рапса *in vitro*

Е. В. Чеснокова, научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса.

А. А. Муравлев<sup>✉</sup>, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии рапса

Липецкий научно-исследовательский институт рапса – филиал ФГБНУ ФНЦ «ВНИИМК им. В.С. Пустовойта»

398037, Россия, Липецкая область, г. Липецк, ул. Боевой проезд, д. 26.

<sup>✉</sup>anatoly.muravleff@yandex.ru

**Резюме.** В статье приведены результаты исследований по изучению влияния различных концентраций сахарозы на развитие неоплодотворённых семязачатков ярового рапса (*Brassica napus* L.) на искусственных питательных средах *in vitro*. В качестве донорного материала использовали сорт ярового рапса Амулет селекции ВНИИМК, 3 образца лаборатории селекции (LHR-3, LHR-5, LHR-6) и линия (№12), полученная ранее через культуру ткани. Донорные растения выращивали в условиях полевого питомника лаборатории биотехнологии ЛНИИР. Изолированные семязачатки из бутонов проводили на стадии зрелого 7-клеточного 8-ядерного зародышевого мешка в асептических условиях ламинарного бокса. Посадку эксплантов осуществляли на питательную среду минерального состава МС с добавлением регуляторов роста: 2,4-Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л. В исследовании было использовано 6 вариантов концентраций сахарозы: 3, 6, 9, 12, 15 и 18 %. Для проведения исследования на питательные среды было высажено более 6000 семязачатков. Культивирование эксплантов проводили на свету при 16-часовом фотопериоде, освещённости 5000 люкс, температуре 25...26°C и влажности воздуха 70 %. Длительность опыта составила 4 недели. Наблюдение и оценку развития эксплантов проводили каждые 7...10 дней. Результаты обрабатывали методом дисперсионного анализа в программе MS Excel. Каллусогенез наблюдался на всех 6 вариантах сред. Наибольшее число каллусов было получено на среде, содержащей 6 % сахарозы. Увеличение концентрации дисахарида с 6 до 12 % приводило к снижению числа образовавшихся каллусов, но повышало жизнеспособность семязачатков. Концентрация свыше 12 % существенно ингибировала каллусогенез. При 18 % концентрации сахарозы в питательной среде наблюдалось полное угнетение развития неоплодотворённых семязачатков. Результаты проведённых исследований показали, что оптимальной для индукции неоплодотворённых семяпочек ярового рапса *in vitro* является 6 % концентрация сахарозы.

**Ключевые слова:** гиногенез, неоплодотворённые семязачатки, сахароза, каллусогенез, *in vitro*, зародышевый мешок, гаплоидия.

**Для цитирования:** Чеснокова Е. В., Муравлев А. А. Влияние концентрации сахарозы на развитие неоплодотворённых семязачатков ярового рапса *in vitro* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №2 (62). С. 57-61 doi:10.18286/1816-4501-2024-2-57-61

## Influence of sucrose concentration on development of unfertilized spring rapeseed ovules *in vitro*

Е. В. Chesnokova, А. А. Muravlev<sup>✉</sup>

Lipetsk Rapeseed Research Institute – the Branch of Federal State Budgetary Scientific Institution, Federal Scientific Center, «All-Russian Research Institute of Oil crops named after V.S. Pustovoit »

398037, Russia, Lipetsk region, Lipetsk, Boevoy proezd str., 26.

<sup>✉</sup>anatoly.muravleff@yandex.ru

**Abstract.** The present article states the results of the research examining the influence of various sucrose concentrations on development of unfertilized spring rapeseed (*Brassica napus* L.) ovules on artificial nutrient media *in vitro*. Amulet variety of spring rapeseed bred by the All-Russian Research Institute of Oil crops was used as donor material, particularly, 3 samples from the breeding laboratory (LHR-3, LHR-5, LHR-6) and a line (No. 12) which had been previously obtained by tissue culture process. The donor plants were grown in the field nursery of Lipetsk Rapeseed Research Institute biotechnology laboratory. Isolation of ovules from buds was carried out at the stage of a mature 7-cell, 8-nucleate embryo sac under aseptic conditions in a laminar-flow box. The explants were planted on a nutrient medium of mineral composition with an addition of growth regulators: 2,4-D – 2.0 mg/l, 6-benzylaminopurine – 0.5 mg/l. Six sucrose concentrations were applied for this research: 3, 6, 9, 12, 15 and 18%. For the study, more than 6,000 ovules were planted on nutrient media. Explant cultivation was carried out on the light with a 16-hour photoperiod, with 5000 lux illumination, 25-26°C

temperature and 70% air humidity. The experiment took 4 weeks. Explant development observation and assessment was carried out every 7-10 days. The research results were processed by variance analysis in MS Excel. Callusogenesis was observed in all 6 media variants. The largest number of calli was obtained on the medium containing 6% sucrose. Increase of the disaccharide concentration from 6 to 12% led to a decrease in the number of calli formed, but it increased the viability of the ovules. Concentrations above 12% significantly inhibited callusogenesis. With 18% sucrose concentration in the nutrient medium, complete inhibition of the unfertilized ovules development was observed. Thus, the results of the studies showed that a 6% sucrose concentration is most favorable for the induction of unfertilized spring rapeseed ovules *in vitro*.

**Keywords:** gynogenesis, unfertilized ovules, sucrose, callusogenesis, *in vitro*, embryo sac, haploidy.

**For citation:** Chesnokova E. V., Muravlev A. A. Influence of sucrose concentration on development of unfertilized spring rapeseed ovules *in vitro* // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;2(66): 57-61 doi:10.18286/1816-4501-2024-2-57-61

#### Введение

Рапс яровой (*Brassica napus L.*) – одна из ведущих масличных культур в современном мире. Наиболее эффективным способом повышения продуктивности рапса является создание гетерозисных гибридов. Для получения гибридных семян широко используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), которая позволяет контролировать скрещивание материнских и отцовских линий. Для ускорения селекционного процесса и получения нового гомозиготного материала для гетерозисной селекции на основе ЦМС используется гиногенез – культивирование неоплодотворённых семязачатков на искусственных питательных средах *in vitro* [1]. Развитие семяпочек идёт по пути образования каллуса с формированием на нём ростовых почек и их дальнейшем развитии в растения. Существующая технология получения гиногенных линий ярового рапса имеет низкую эффективность, поэтому изучение, улучшение и поиск новых условий культивирования является актуальной и приоритетной задачей.

При культивировании изолированных растительных тканей *in vitro* углеводы являются неотъемлемым компонентом искусственных питательных сред, выполняя функцию не только углеводного питания и источника энергии, но и условием поддержания необходимого для клеток осмотического давления.

Эффективности использования различных углеводов *in vitro* посвящён целый ряд научных работ [2, 3, 4, 5]. Анализ литературных данных показал, что в культуре растительных тканей и клеток успешно используют как дисахариды (сахароза, мальтоза, мелибиоза), так и моносахариды (глюкоза, фруктоза). Отзывчивость эксплантов к источнику углеводного питания в культуральной среде имеет видовую и сортовую специфичность, а также зависит от типа экспланта и направления его развития.

На культуре пыльников тритикале и озимой пшеницы показано, что наиболее эффективной для индукции андрогенеза и регенерации растений является 6 % концентрация сахарозы. Замена сахарозы в индукционной питательной среде на глюкозу и мелибиозу оказывала отрицательное воздействие на эмбриогенез пыльников и индукцию новообразований [2].

В каллусной культуре чайного растения (*Camellia sinensis L.*) сахароза способствовала лучшему росту эксплантов. На среде с сахарозой прирост каллусов был на 20 % выше, чем на среде с такой же концентрацией глюкозы [3]. Аналогичные данные были получены ранее на культуре сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*), где замена сахарозы на глюкозу и фруктозу приводила к снижению частоты индукции морфогенного каллуса. Наибольшая частота каллусообразования наблюдалась на среде с 3 % сахарозой [4].

При регенерации растений *in vitro* полученные данные не однозначны, наблюдается ярко выраженная видовая и сортовая специфичность по отношению к источнику углеводного питания. При микроклональном размножении роз (*Rosa L.*) замена сахарозы на глюкозу приводила к увеличению высоты растений, побегообразования и, соответственно, коэффициента размножения [5]. На культуре тканей сои (*Glycine max (L.) Merr.*) было установлено, что 3 % сахарозы в питательной среде вызывает самую высокую частоту регенерации побегов. Снижение частоты регенерации наблюдалось в следующем порядке: сахароза > фруктоза > глюкоза > мальтоза [6]. При микроклональном размножении салата листового (*Lactuca sativa L.*) замена 2 % сахарозы на глюкозу не показала отличий в регенерации растений [7]. А при регенерации растений гортензии (*Hydrangea L.*) была выявлена сортовая специфичность эксплантов по отношению к источнику углеводного питания. У гортензии крупнолистной сорта Peppermint наибольший коэффициент размножения микропобегов был получен на питательной среде, содержащей 2 % глюкозы, тогда как у сорта Candlelight наибольший коэффициент размножения наблюдали на среде, содержащей 3 % сахарозы [8].

Резюмируя анализ найденных литературных источников, можно сделать вывод, что основным, традиционно используемым и наиболее эффективным углеводом в культуре *in vitro* является сахароза.

Цель исследования: изучить влияние различных концентраций сахарозы на отзывчивость неоплодотворённых семязачатков ярового рапса в культуре *in vitro*. В рамках достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: ввести в культуру *in vitro* изолированные семязачатки и определить частоту дедифференциации

эксплантов на питательной среде, содержащей различные концентрации сахарозы.

#### Материалы и методы

В качестве донорного материала использовали сорт ярового рапса Амулет селекции ВНИИМК, а также образцы лаборатории селекции и линия, полученная через культуру ткани в лаборатории биотехнологии ЛНИИР.

Донорные растения выращивали в полевых условиях. Бутоны собирали с центральной кисти и побегов первого порядка в утренние часы. Длина бутонов, взятых для исследования, составляла 6,0...8,0 мм (в зависимости от генотипа). Размер бутонов в соцветиях ярового рапса считается маркерным признаком стадии развития женского гаметофита. Неоплодотворённые семязачатки, выделенные из бутонов указанного размера, содержат зрелые или почти зрелые зародышевые мешки. Именно на этой стадии развития гаметофита семязачатки обладают наибольшей компетентностью к развитию на питательной среде *in vitro*, что было показано результатами предшествующих исследований [9].

Стерилизацию бутонов проводили в 70 % этаноле в течение 30 сек., затем в 2 % растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин с последующим трёхкратным промыванием стерильной дистиллированной водой. Извлечение неоплодотворённых семязачатков из бутонов и помещение их на питательные среды осуществлялось под бинокулярной лупой МБС-10 вручную – с помощью наборов тонких игл, скальпелей и пинцетов. Все манипуляции с отобранными бутонками осуществлялись в стерильных условиях ламинарного бокса.

После извлечения семязачатки помещались в пробирки на поверхность питательной среды в количестве 18...22 штук. В качестве инициальной использовалась среда минерального состава МС с добавлением следующих регуляторов роста: 2,4-Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л. Исследовано 6 вариантов концентраций сахарозы: 3, 6, 9, 12, 15 и 18 %. В качестве контрольной использовали среду, содержащую 3 % сахарозы, так как она считается оптимальной для процессов каллусогенеза и органогенеза соматических тканей ярового рапса *in vitro*.

Культивирование эксплантов проводилось на свету при 16-часовом фотопериоде, освещённости 5000 люкс, температуре 25...26°C и влажности воздуха 70 %. Длительность опыта составила 4 недели. Наблюдение и оценку развития эксплантов проводили каждые 7...10 дней. Результаты обрабатывали методом дисперсионного анализа в программе MS Excel.

#### Результаты

Во время проведения исследования на инициальные питательные среды было высажено более 6000 неоплодотворённых семязачатков ярового

рапса. В результате культивирования каллусы получили на всех 6 вариантах, а частота каллусогенеза составила от 0,1 до 15,7 % (табл. 1). Наибольшее число каллусов – 15,7 % было получено на питательной среде, содержащей 6 % сахарозы, что значительно больше количества каллусов, полученных на контрольном варианте (9,3 %).

Таблица 1. Влияние концентрации сахарозы на отзывчивость неоплодотворённых семязачатков ярового рапса

Вариант	Концентрация сахарозы	Культивируемых семяпочек	Живых семяпочек (%)	Каллусов (%)
I (контр.)	3 %	1598	25,3	9,3
II	6 %	708	22,6	15,7
III	9 %	705	30,1	9,9
IV	12 %	1517	34,0	3,8
V	15 %	838	30,9	1,1
VI	18 %	807	24,5	0,1
			HCP <sub>0,5</sub> = 0,24	HCP <sub>0,5</sub> = 0,56

Дальнейшее повышение концентрации сахарозы в питательной среде привело к плавному снижению каллусогенеза и повышению жизнеспособности неоплодотворённых семязачатков. Данная зависимость хорошо прослеживается на диаграмме (рис. 1).

Графическое изображение позволяет отметить, что 6 % концентрация сахарозы является наиболее оптимальной для развития неоплодотворённых семязачатков ярового рапса. Увеличение концентрации дисахарида до 12 % приводит к повышению жизнеспособности эксплантов и снижению числа образовавшихся из них каллусов до 3,8 %. Семяпочки долго оставались живыми и зелёными на инициальной питательной среде, но потеряли способность к дальнейшему развитию. Пересадка их на свежую органогенную среду с пониженным до 3 % содержанием сахарозы не привела к развитию эмбриогенного или шероховатого каллусов. Концентрация сахарозы свыше 12 % в питательной среде практически полностью ингибировала способность неоплодотворённых семяпочек ярового рапса к дедифференциации.

Донорные образцы ярового рапса, которые были использованы в опыте, проявили неодинаковую отзывчивость на питательных средах (табл. 2). Наибольшую склонность к каллусогенезу показала линия LHR-6 (10,8 %) и сорт Амулет (8,2 %). Наименьшее число каллусов (2,1 %) было получено у образца № 12. Полученные данные подтверждают, что отзывчивость неоплодотворённых семязачатков ярового рапса на искусственных питательных средах зависит от генотипа донорного образца. Высоко отзывчивые образцы будут отобраны для проведения дальнейших исследований.

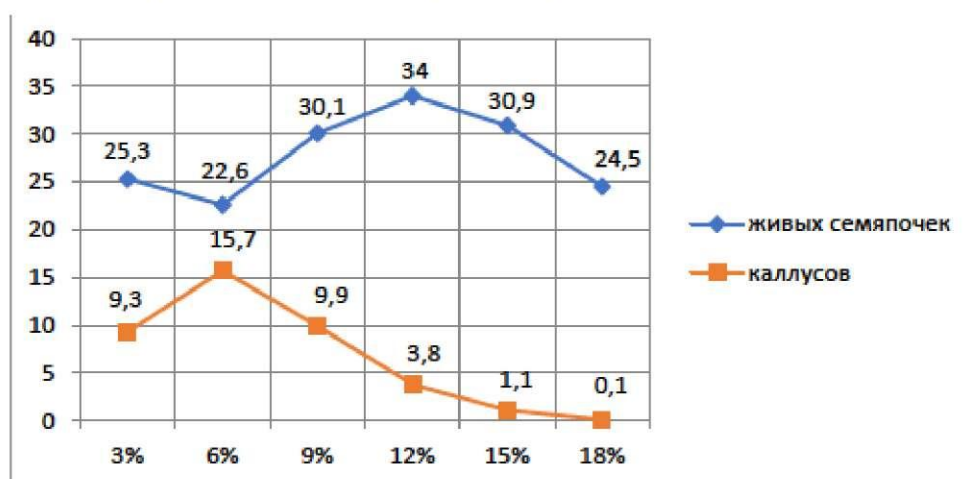


Рис. 1. Зависимость каллусогенеза и жизнеспособности неоплодотворённых семяпочек ярового рапса от концентрации сахарозы в инициальной питательной среде

Таблица 2. Отзывчивость донорных образцов ярового рапса

Донор. образец	Культивируемых семяпочек	Живых семяпочек (%)	Каллусов (%)
Амулет	2753	31,7	8,2
№ 12	1826	29,1	2,1
LHR-3	535	31,2	6,0
LHR-5	303	16,8	3,3
LHR-6	756	22,0	10,8
		$HCP_{0,5} = 0,83$	$HCP_{0,5} = 0,63$

#### Обсуждение

Полученные нами данные согласуются с исследованием, проведённым на картофеле, в котором также было показано ингибирующее действие высоких концентраций сахарозы в питательной среде на ростовые процессы растений [10]. Повышенные концентрации сахарозы используются также в депонировании растений винограда в условиях длительного беспересадочного культивирования *in vitro*, так как они замедляют ростовые процессы, не вызывая токсического эффекта [11]. Для этих же целей

эффективно использовать менее энергоёмкие, по сравнению с сахарозой, источники углеводного питания, такие как сорбит и глюкоза [12].

#### Заключение

Оптимальной для индукции неоплодотворённых семяпочек ярового рапса является 6 % концентрация сахарозы. Концентрации сахарозы в инициальной питательной среде свыше 12 % ингибируют каллусогенез и приводят к потере семяпочками способности к дальнейшему развитию.

#### Литература

- Горягина Е. Б., Никоноренков В. А., Подвигина О. А. и др. Способ создания восстановителей фертильности ярового рапса (*Brassica napus* L.) / Патент РФ № 2366705. 10.09.2009.
- Голованова И. В., Тихомирова Л. И. Влияние холодового стресса и сахаров питательной среды на андрогенез в культуре пыльников тритикале и пшеницы // Генофонд и селекция растений. Тезисы докладов III Международной конференции, посвященной 130-летию Н.И. Вавилова. Новосибирск 2017. С. 15.
- Углеводы питательной среды и их влияние на рост и накопление фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения (*Camellia Sinensis* L.) / Н. В. Загоскина, Т. Л. Нечаева, Т. Н. Николаева и др. // Научные ведомости Белгородского Государственного Университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 25 (246). С. 45-55.
- Мишуткина Я. В., Гапоненко А. К. Изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на частоту регенерации растений сахарной свеклы (*Beta Vulgaris* L.) *in vitro* // Генетика. 2006. Т. 42. № 2. С. 210-218.
- Заидано О. Х., Егорова Д. А. Особенности клонального микроразмножения некоторых декоративных сортов роз // Современные проблемы гуманитарных и естественных наук. Материалы XXXIV международной научно-практической конференции. Москва 2017. С. 17-22.
- Беспалова Е. С., Ершова К. М., Ухатова Ю. В. Регенерация сои в культуре *in vitro* (обзор) / Е.С. Беспалова, // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021. Т. 182. № 4. С. 148-155. doi: 10.30901/2227-8834-2021-4-148-155.
- Романова О. В., Солдатенко А. В., Романов В. С. Система регенерации салата (*Lactuca Sativa* L.) через культуру *in vitro* // Овощи России. 2019. № 3 (47). С. 15-17. doi: 10.18619/2072-9146-2019-3-15-17.

8. Крахмалева И.Л., Ахметова Л. Р., Молканова О. И. Влияние источника углеродного питания на морфогенетический потенциал представителей рода *Hydrangea* L. в культуре *in vitro* // Тенденции развития науки и образования. 2019. № 50-3. С. 44-47. doi: 10.18411/lj-05-2019-51.

9. Чеснокова Е. В., Муравлёв А. А. Влияние некоторых технологических аспектов *in vitro* на дедифференциацию неоплодотворённых семязачатков ярового рапса (*Brassica napus* L.) // Вестник КРАСГАУ. 2021. № 7 (172). С. 66-72. doi: 10.36718/1819-4036-2021-7-66-72.

10. Мякишева Е. П. Влияние сахарозы на показатели развития растений регенерантов картофеля (*Solanum Tuberosum* L.) в культуре *in vitro* // Материалы международной научно – практической конференции Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования. Барнаул. 2014. С. 1214-1216.

11. Дорошенко Н. П., Куприкова А. С., Пузырнова В. Г. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда в коллекции *in vitro* // Плодоводство и виноградарство юга России. 2017. № 46 (04). С. 33-48.

12. Пузырнова В. Г., Дорошенко Н. П. Особенности применения углеводов для создания коллекции винограда *in vitro* // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2023. Т. 25. № 1 (123). С. 14-23. doi: 10.34919/IM.2023.25.1.002.

#### References

1. A method for creating spring rape fertility restoring agents (*Brassica napus* L.) / E. B. Goryagina, V. A. Nikonorenkov, O. A. Podvigina, V. V. Karpachev // Russian Federation. patent No. 2366705. 10.09.2009.

2. Golovanova I.V., Tikhomirova L.I. Influence of cold stress and sugars in the nutrient medium on androgenesis in the culture of triticale and wheat anthers // International Conference “Genepool and Plant Breeding”. Abstracts of reports of the III International Conference dedicated to the 130th anniversary of N. I. Vavilov. Novosibirsk. 2017. P.15.

3. Carbohydrates in the culture medium and their influence on growth and accumulation of phenolic compounds in tea plant callus culture (*Camellia Sinensis* L.) / N. V. Zagoskina, T. L. Nechayeva, T. N. Nikolaeva, et al. // Scientific Vestnik of Belgorod State University. Series: Natural Sciences. 2016. No. 25 (246). P. 45-55.

4. Mishutkina Ya. V., Gaponenko A. K. Study of the influence of nutrient medium composition, explant type and genotype on the frequency of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) plants regeneration *in vitro* // Genetics. 2006. Vol. 42. No. 2. P. 210-218.

5. Zaidano O. Kh., Egorova D. A. Features of clonal micropropagation of some ornamental varieties of roses // Modern problems of the humanities and natural sciences. Materials of the XXXIV international scientific and practical conference. Moscow 2017. P. 17-22.

6. Bespalova E. S., Ukhatoва Yu. V., Ershova K. M. *In vitro* regeneration of soybean (review) // Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2021. Vol. 182. No. 4. P. 148-155. doi: 10.30901/2227-8834-2021-4-148-155.

7. Romanova O. V., Soldatenko A. V., Romanov V. S. Regeneration system of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) through *in vitro* culture // Vegetable crops of Russia. 2019. No. 3 (47). P. 15-17. doi: 10.18619/2072-9146-2019-3-15-17.

8. Krakhmaleva I. L., Akhmetova L. R., Molkanova O. I. The effect of carbon nutrition on morphogenetic potential of representatives of *Hydrangea* L. genus in *in vitro* culture // Trends in the development of science and education. 2019. No. 50-53. P. 44-47. doi: 10.18411/lj-05-2019-51.

9. Chesnokova E. V., Muravlev A. A. Some technological aspects *in vitro* impact on spring rapeseed (*Brassica napus* L.) unfertilized ovules dedifferentiation // Vestnik of KrasSAU. 2021. No. 7 (172). P. 66-72. doi: 10.36718/1819-4036-2021-7-66-72.

10. Myakisheva E. P. Effect of sucrose on development parameters of regenerated potato plants (*Solanum Tuberosum* L.) in *in vitro* culture // Lomonosov's Reading in Altai: Fundamental Problems of Science and Education, International conference. Collection of articles from the international conference. Barnaul 2014. P. 1214-1216.

11. Doroshenko N. P., Kuprikova A. S., Puzyrnova V. G. Effect of sucrose on retardation of growth and preservation of grape plants in the collection *in vitro* // Fruit growing and viticulture in the South of Russia. 2017. No. 46 (04). P. 33-48.

12. Puzyrnova V. G., Doroshenko N. P. Peculiarities of using carbohydrates to create a collection of grapes *in vitro* // Magarach. Viticulture and Winemaking 2023. Vol. 25. No. 1 (123). P. 14-23. doi: 10.34919/IM.2023.25.1.002.