

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ

Минейкина А. И. , Домблидес Е. А. , Домблидес А. С. , Бондарева Л. Л.

ФГБНУ "Федеральный научный центр овощеводства"
anna-batmanova@mail.ru

Капуста белокочанная (*B. oleracea* L. convar *capitata* (L.) Alef. var. *capitata* L. f. *alba* DC) выращивается более чем в 90 странах мира и является одной из основных овощных культур России. По уровню потребления она занимает третье место (после зерновых и картофеля), а по объему выращивания - лидирующее место среди овощных культур. Учитывая биологические особенности этой культуры (перекрёстноопыляемая, с двухлетним циклом развития, требующая длительного периода яровизации) селекционный процесс по созданию линий для гетерозисных гибридов F1 требует больших временных и трудовых затрат, сократить которые возможно только с использованием самых последних передовых биотехнологий. Технология культуры изолированных микроспор *in vitro* существенно ускоряет этапы селекции растений за счет быстрого (за 1-2 года) получения удвоенных гаплоидов (от англ. Doubled Haploid (DH)) – чистых линий со 100% гомозиготностью, потомство которых не расщепляется в последующих поколениях. Главными факторами, сдерживающими широкое применение технологии, являются генотипспецифичная реакция растений на индукцию андрогенеза при введении в культуру *in vitro* мужского гаметофита и низкая частота регенерации побегов из эмбриоидов.

Для возможности практического использования DH - технологии в селекционном процессе необходим высокий уровень ее эффективности, который можно достичь за счет выявления и модификации потенциально взаимодействующих факторов, влияющих на основные этапы технологии: индукцию гаплоидного эмбриогенеза, удвоение хромосомного набора, регенерацию удвоенных гаплоидов и получение семенного потомства. В результате исследований нами были выявлены и модифицированы основные критические факторы, влияющие на успешность эмбриогенеза капусты белокочанной. К ним относятся: стадия развития микроспор, высокотемпературный стресс и кислотность питательной среды. Индукцию андрогенеза наблюдали при введении в культуру *in vitro* микроспор на поздней вакуолизированной стадии и на стадии ранней двухклеточной пыльцы. При этом максимальный выход эмбриоидов был достигнут при сочетании высокотемпературной шоковой обработки микроспор при 32°C в течении 2 суток и рН питательной среды NLN-13 5,8-6,0.

Регенерация проростков из эмбриоидов, достигших семядольной стадии, была успешной при использовании агаризованных питательных сред: безгормональной среды MS и среды B5 с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л гиббереллиновой кислоты.

Благодаря полному комплексу условий для успешного эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной был достигнут максимальный выход эмбриоидов - 257,33±21,67шт./чашку Петри. Использование проточной цитометрии на ранней этапах развития DH-растений позволил отделить удвоенные гаплоиды от гаплоидов, тетраплоидов и миксоплоидов. Анализ с микросателлитными (SSR) маркерами показал наличие всего одной аллели у полученных растений, что может подтверждать их гомозиготное состояние.

Ключевые слова: капуста белокочанная, удвоенные гаплоиды, культура изолированных микроспор *in vitro*.

USING BIOTECHNOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC METHODS FOR ACCELERATED SELECTION OF WHITE CABBAGE

Mineykina A. , Domblides E. , Domblides A. , Bondareva L.

FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
anna-batmanova@mail.ru

White cabbage (*B. oleracea* L. convar *capitata* (L.) Alef. var. *capitata* L. f. *alba* DC) is grown in more than 90 countries of the world and is one of the main vegetable crops of Russia. In terms of consumption, it ranks third (after cereals and potatoes), and in terms of cultivation volume, it is the leader among vegetable crops. Taking into account the biological specifics of this crop (cross-pollinated, with a two-year cycle of development, requiring a long period of vernalization), the selection process to develop lines for heterosis F1 hybrids requires a lot of time and labor costs, which can be reduced only by using the latest advanced biotechnology. *In vitro* culture of isolated microspores *in vitro* significantly accelerates the stages of plant breeding by quickly (1-2 years) obtaining Doubled Haploid (DH). - pure lines with 100% homozygous, the progeny of which are not split in subsequent generations. The main factors limiting the wide application of the technology are the genotype-specific response of plants to the induction of androgenesis when the male gametophyte is introduced into *in vitro* culture and the low frequency of shoot regeneration from embryoids.

For the possibility of practical use of DH-technology in the breeding process, a high level of its efficiency is required, which can be achieved by identifying and modifying potentially interacting factors affecting the main stages of the technology: induction of haploid embryogenesis, doubling of the chromosome set, regeneration of doubled haploids and production of seed progeny. As a result of our research, we identified and modified the main critical factors affecting the success of white cabbage embryogenesis. These include: microspore developmental stage, high temperature stress and acidity of the nutrient medium. Induction of androgenesis was observed when microspores at the late vacuolized stage and at the early two-cell pollen stage were introduced into *in vitro* culture. The maximum yield of embryoids was achieved with a combination of high-temperature shock treatment of microspores at 32°C for 2 days and pH of nutrient medium NLN-13 5.8-6.0.

Regeneration of shoots from embryoids that had reached the cotyledon stage was successful using agarized nutrient media: hormone-free MS medium and B5 medium supplemented with 1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.1 mg/L gibberellic acid.

As a result of a full complex of parameters for successful embryogenesis of white cabbage microspores, the maximum yield of embryoids was reached - 257.33 ± 21.67 sht./Petri dish. The use of flow cytometry early in the development of DH plants allowed us to separate doubled haploids from haploids, tetraploids, and mixoploids. Analysis with microsatellite (SSR) markers showed the presence of only one allele in the obtained plants, which may confirm their homozygous state.

Keywords: white cabbage, doubled haploids, isolated microspore culture *in vitro*.