

**Рисунок – Результаты мультиплексного фрагментного анализа сортов риса Сонет (1) и Соната (2) по микросателлитным маркерам RM1, RM11 и RM122**

### Литература

1. Савенко Е. Г., Глазырина В. А., Мухина Ж. М. Разработка системы прямой регенерации растений // Рисоводство. 2002. № 1. С. 19.
2. Малышева Н. Н., Савенко Е. Г., Глазырина В. А., Шундрин Л. А. Комплексная оценка дигаплоидных линий риса // Материалы Международного АгроБизнес Форума «Развитие сельскохозяйственного производства в условиях Таможенного союза». Кызылорда, 2010. С. 67–71.
3. Малышева Н. Н., Савенко Е. Г., Глазырина В. А., Шундрин Л. А. Получение, оценка и отбор дигаплоидных линий риса с хозяйственно-ценными признаками // Рисоводство. 2012. Т. 21. С. 14–18.

UDC 57.085.23; 577.2

Savenko E. G., Mukhina Zh. M., Glazyrina V. A.

#### **Use of experimental biotechnology for accelerated development of breeding material**

**Summary.** The combination of such biotechnological techniques as experimental haploidy and molecular marking allows developing breeding material with simultaneous DNA analysis of its genetic homogeneity (obtaining microsatellite profiles). According to the results of SSR genotyping, DNA passports were obtained for androgenic cultivars ‘Sonnet’ and ‘Sonata’.

**Keywords:** *in vitro*, haploidy, molecular marking, genotyping.

**DOI 10.33952/2542-0720-2020- 5-9-10-94**

УДК 57.085.23; 577.2

Савенко Елена Георгиевна, Мухина Жанна Михайловна, Глазырина Валентина Александровна, Шундрин Людмила Анатольевна

#### **Контроль гаметного происхождения регенерантов капусты белокочанной в культуре пыльников *in vitro***

ФГБНУ «Федеральный научный центр риса»  
e-mail: avena5@rambler.ru

Гаплоидные технологии (андрогенез) расширяют спектр формообразовательного процесса, облегчают отбор полезных генов, способствуют

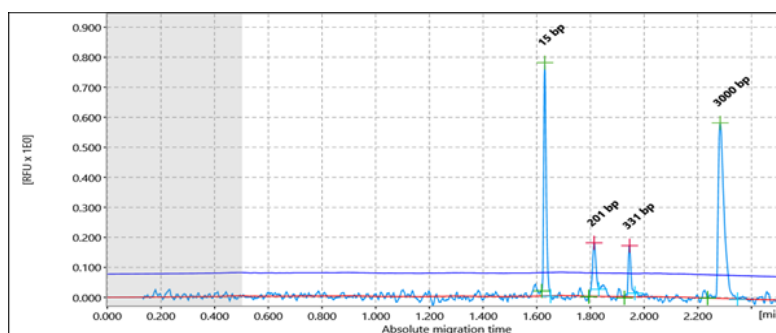
обнаружению редких рецессивных аллелей, помогают создать уникальные формы, таким образом, повышают эффективность практической селекции [1, 2]. При получении регенерантов капусты белокочанной в культуре пыльников, а не микроспор *in vitro*, очень важно идентифицировать ploидность растений и ранжировать их на гаплоиды и диплоиды еще на пробирочном уровне, так как есть вероятность регенерации растений из соматически клеток стенки пыльника.

Цель исследования – методическая схема контроля гаметного происхождения (микроспоры), получаемых в культуре пыльников *in vitro* регенерантов капусты белокочанной *Brassica oleracea* L.

В исследованиях использовали гибриды капусты белокочанной. Работы велись по общепринятым методикам *in vitro*. Выделение ДНК осуществляли методом СТАВ, ПЦР-анализ с использованием SSR-маркеров, доступных на сайте <http://www.brassica.info> [3]. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляли с использованием электрофореза в 2 % агарозном геле.

Pлоидность андрогенных растений определяли с помощью подсчёта хлоропластов в устьичных клетках, а также с помощью прямого подсчета хромосом в препаратах корневых меристем. При исследовании устьиц эпидермиса регенерантов обнаружено, что у части растений в паре замыкающих устьиц 10–15 хлоропластов, у части растений в паре замыкающих клеток насчитывалось 6 – 9 хлоропластов.

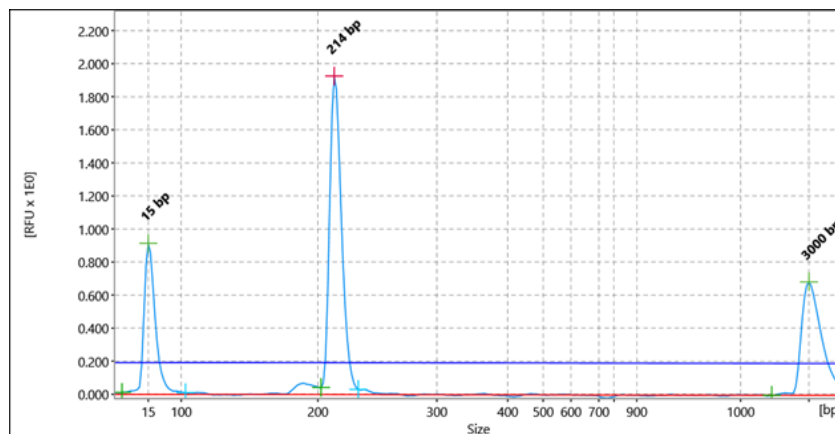
При подсчете хромосом в корневых меристемах оказалось, что у растений, в паре замыкающих клеток устьиц которых обнаружено 6–9 хлоропластов, насчитывалось 9 хромосом, то есть эти регенеранты имели гаплоидную природу. Регенеранты, имеющие 18 хромосом, имели 10-15 хлоропластов в паре замыкающих клеток и были либо спонтанно удвоенными гаплоидными растениями, либо имели происхождение из соматических тканей пыльника. Для проверки и подтверждения гаметного происхождения растений, полученных из пыльников капусты белокочанной, сравнивали аллельное состояние ДНК (микросателлитных SSR) локусов доноров и регенерантов. Обязательным условием информативности молекулярных маркеров было состояние гетерозиготности у донорных растений в изучаемом микросателлитном локусе. Изучено 10 SSR маркеров. SSR-локусы, в которых донорные растения оказались гомозиготными, были отбракованы. Локус BoIAB20TR оказался гетерозиготным у большинства изученных донорных генотипов капусты белокочанной, именно он был выбран для дальнейшей работы.



**Рисунок 1 – Микросателлитный профиль регенеранта № 74p2 в локусе BoIAB20TR (пики (красный цвет) соответствуют выявленным аллелям с указанием их размера)**

Гарантированно гаметное происхождение имели только регенеранты, имеющие гомозиготное состояние в указанном ДНК-локусе при условии, что их

доноры демонстрировали в нем гетерозиготность. Из рисунка 1 очевидно, что растение-регенерант № 74р2, полученное от донора № 74, оказалось гетерозиготным в микросателлитном локусе *BoIAB20TR*, что было бы невозможным в случае гаметного происхождения данного растения. Следовательно, данный регенерант соматического происхождения из клеток стенки пыльника. Он был выбракован.



**Рисунок 2 – Микросателлитный профиль регенеранта № 115/1 р3 (донор № 115/1) в локусе VN83B 1 (пик отмечен красным цветом и соответствует выявленной аллели с указанием ее размера)**

На рисунке 2 микросателлитный профиль в локусе VN83B1 регенеранта № 115/1р3 (донор № 115). Данное растение в данном локусе гомозиготно, при том, что растение-донор в этом локусе было гетерозиготно. Следовательно, регенерант имеет гаметное происхождение непосредственно из микроспоры. Растения-регенеранты, имеющие по данным ДНК-анализа гаметное происхождение, высаживали в теплицу для оценки морфотипа грунт-контролем. Оценено аллельное состояние микросателлитного локуса *BoIAB20TR* у 65 регенерантов.

Таким образом, данные ДНК исследований полностью подтвердили цитологические (косвенные) методы определения ploидности андрогенных регенерантов капусты белокочанной.

#### Литература

1. Forster B. P., Thomas W. T. B. Doubled haploids in genetics and plant breeding // *Plant Breed Rev.* 2005. Vol. 25. P. 57–88.
2. Ferrie A. M. R., Caswell K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2011. Vol. 104. P. 301. DOI:10.1007/s11240-010-9800-y.
3. Электронный ресурс «Брассика». Режим доступа: <http://www.brassica.info> (дата обращения 30.04.2020).

UDC 57.085.23; 577.2

Savenko E. G., Mukhina Zh. M., Glazyrina V. A., Shundrina L. A.

#### **Control of gamete origin of white cabbage regenerants in anther culture *in vitro***

**Summary.** The complex use of indirect methods (counting chloroplasts in stomatal cells, as well as direct counting of chromosomes in preparations of root meristems) in combination with DNA methods makes it possible to identify ploidy of plants obtained from white cabbage anthers and to rank them on haploids / doubled haploids and diploid ones already on test tube level.

**Keywords:** *in vitro*, regenerant, DH haploidy, molecular marking.