

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

АГРАРНЫЕ НАУКИ
AGRARIAN SCIENCES

УДК 633.853.494«324»:631.527.56
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Поступило в редакцию 16.09.2024
Received 16.09.2024

Я. Э. Пилюк, Е. Н. Кулинкович, Н. Н. Бобко, А. А. Новичек

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию,
Жодино, Республика Беларусь*

**КОМПЛЕКСНАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ
И ЛИНИЙ ОЗИМОГО РАПСА, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОРЫ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ**

(Представлено членом-корреспондентом Э. П. Урбаном)

Аннотация. Представлены результаты изучения цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) рапса озимого (*Brassica napus ibernalis* L.). С использованием гистологических, морфобиологических и биохимических методов выделено 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura; а также 2 линии для ЦМС Ogura и 1 для ЦМС Polima со 100 %-ной восстанавливающей способностью. Проведена оценка комбинационной способности более 20 материнских родительских ЦМС линий и получено свыше 500 экспериментальных простых стерильных и восстановленных гибридов на основе ЦМС типа Ogura. С использованием культуры *in vitro* получены удвоенные гаплоиды родительских линий рапса озимого, установлены особенности протекания процессов эмбриогенеза, морфогенеза и ризогенеза.

Ключевые слова: рапс озимый, селекция, гетерозис, ЦМС Ogura и Polima, культура *in vitro*, эмбриод, каллус, регенерант, дигаплоид

Для цитирования. Комплексная фенотипическая оценка селекционных форм и линий озимого рапса, содержащих факторы цитоплазматической мужской стерильности / Я. Э. Пилюк [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 519–528. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Ya. E. Piliuk, E. N. Kulinkovich, N. N. Bobko, A. A. Novichuk

*Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming,
Zhodino, Republic of Belarus*

**COMPLEX PHENOTYPIC EVALUATION OF WINTER RAPE BREEDING FORMS
AND LINES CONTAINING FACTORS OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY**

(Communicated by Corresponding Member Eroma P. Urban)

Abstract. The paper presents the results of studying cytoplasmic male sterility (CMS) of winter rape (*Brassica napus ibernalis* L.). Using histological, morphobiological, and biochemical methods, 12 sterility fixer lines for Ogura-type CMS as well as 2 lines for Ogura CMS and 1 line for Polima CMS with 100 % restoring ability were isolated. The combining ability of more than 20 maternal parental CMS lines was evaluated and more than 500 experimental simple sterile and restored hybrids based on Ogura CMS were obtained. Using *in vitro* culture, doubled haploids of parental lines of winter rape were obtained, and the peculiarities of embryoidogenesis, morphogenesis and rhizogenesis were established.

Keywords: winter rape, breeding, heterosis, CMS Ogura and Polima, *in vitro* culture, embryoid, callus, regenerate, dihaploid

For citation. Pilyuk Ya. E., Kulinkovich E. N., Bobko N. N., Novichuk A. A. Complex phenotypic evaluation of winter rape breeding forms and lines containing factors of cytoplasmic male sterility. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 519–528 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Введение. Рапс – уникальная масличная культура, имеющая широкие возможности применения как на пищевые и кормовые, так и на технические цели. В Республике Беларусь эта культура имеет наибольшую урожайность среди других масличных культур, что связано также и с использованием эффекта гетерозиса, который является важным резервом увеличения производства маслосемян и весьма перспективным направлением в селекции гибридов рапса на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) [1–3]. У рапса изучено несколько типов ЦМС, кото-

рые найдены внутри вида или получены на основе отдаленных скрещиваний. Наибольшее практическое применение у этой культуры нашли два типа стерильности – Ogura, полученный в результате межвидовой гибридизации, и Polima, выделенный из сорта польского происхождения [4; 5].

Механизм, ответственный за стерильность ЦМС Ogura, обусловлен дегенерацией микроспор и тапетума, что согласуется с данными [6], где доказано, что фаза образования тетрад и следующая за ней фаза являются критическим моментом, в который проявляется стерильность. В [7] также установлено, что чаще всего стерильность возникает в фазу формирования тетрад и освобождения микроспор. Стерильность типа ЦМС Polima не является результатом полной блокировки образования пыльцы, а происходит из-за отсутствия или запоздалого развития мужских археспор, вызванного пороговым эффектом суммы или высоты температуры [4].

Рациональное сочетание методов классической селекции с биотехнологическими методами позволяет быстро создавать генетически стабильные гомозиготные линии. Перевод на гомозиготный уровень новой гибридной формы требует в полевых условиях 4–6 лет, в то же время использование методов экспериментальной гаплоидии позволяет выполнить эту операцию в течение одного семенного поколения, т. е. за 1–2 года [8; 9].

Исследования по изучению цитоплазматической мужской стерильности и созданию гибридов F_1 озимого и ярового рапса на ее основе проводятся в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» соответственно с 1988 и 1995 гг. в основном с использованием систем Ogura ЦМС (ogu) и Polima ЦМС (pol), а с 2009 г. в гетерозисной селекции рапса используется еще и система CMSC 301, представленная фирмой Dieckmann Seeds (Германия). Селекция коммерческих гибридов F_1 рапса проводится преимущественно на основе стерильной и фертильной систем ЦМС Ogura. На стерильной основе системы ЦМС Ogura районирован гибрид F_1 рапса озимого Днепр и 3 гибрида рапса ярового: Алмаз, Рубин и Геракл. Гибрид F_1 ярового рапса Алмаз включен с 2014 г. в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации.

Материалы и методы исследования. Исследования по изучению генетических систем озимого рапса с использованием селекционных, морфобиологических и биотехнологических методов проводились в лабораториях и фитотронно-тепличном комплексе (ФТК), а также в полевых условиях на легкосуглинистых и супесчаных почвах РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» Смолевичского района Минской области.

Объект исследования – линии и системы ЦМС озимого рапса селекции НПЦ НАН Беларуси по земледелию. Закладка и оценка полевых опытов осуществлялась по «Методике полевого опыта» [10], «Методическим указаниям по изучению мировой коллекции масличных культур» [11] и «Методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур» [12].

Для выяснения проявления стерильности проводили гистологические исследования пыльников у типов ЦМС Ogura и Polima и для сравнения – у фертильных растений. Исследование микропрепаратов и микрофото съемку проводили с помощью светового микроскопа Optec BK5000 (Китай), оснащенного цифровой камерой. Исследование тканей проводили при увеличении микроскопа $\times 100$. Для анализа плоидности использовали временные давленные препараты точек роста и оснований молодых листочков, которые готовили по стандартным методикам [13].

Для инициации каллусогенеза и получения первичного каллуса использовали среду Келлера–Армстронга [14], включающую минеральные соли В5. Различия в составе питательных сред касались содержания гормонов роста.

При качественном анализе семян определялось содержание сырого жира (методом инфракрасной спектроскопии на приборе NIRS 5000 после калибровки по Сокслету), сырого белка (методом инфракрасной спектроскопии на приборе NIRS 5000 после калибровки по общему азоту), глюкозинолатов (с использованием палладиевого реактива в модификации ВНИИМК, 1986, ISO/CD 9167-3), жирнокислотного состава масла (методом газожидкостной хроматографии, ВНИИМК, 1986, ISO 9167-1) [15].

Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам [10] с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Исследования по изучению источников стерильности типа Ogura и Polima и оценка их по морфобиологическим признакам в полевых и лабораторных условиях проводили в отделах масличных культур, биохимии и биотехнологии НПЦ НАН Беларуси по земледелию.

Изучение посевных качеств стерильных линий показало, что по энергии прорастания и всхожести семян линии на стерильной и фертильной цитоплазме практически не различаются. При оценке фенотипической выраженности стерильности новых образцов озимого рапса с ЦМС типа Ogura и Polima в условиях фитотронно-тепличного комплекса в фазе семядольных листочков, розетки, стеблевания различия между фертильными и стерильными растениями не наблюдались. Морфологические различия между ними проявлялись в фазе цветения. По всем изучаемым типам ЦМС выявлены характерные для стерильности изменения морфологического строения цветка.

Все элементы цветков с ЦМС были значительно меньше, чем у фертильных образцов. Диаметр цветков у ЦМС типа Polima и Ogura по сравнению с фертильными уменьшился в 1,7 и 1,5 раза, длина пыльников – в 2,2 и 2,6 раза, длина лепестков – в 1,6 и 1,5 раза и ширина – в 1,7 раза соответственно. В то же время длина пестика почти не изменилась, что свидетельствует о нормальном развитии женских генеративных органов.

Исследованиями установлено, что у первоначально стерильных растений никогда не происходит дифференциации мужских археспор во всех пыльцевых мешочках (пыльцевых камерах), чаще всего только в 1 или 2 (рис. 1, *a*). В тот период, когда пыльники фертильных растений раскрываются, в развитых пыльцевых мешочках первоначально стерильных растений дозревают зерна пыльцы, которая при благоприятных температурных условиях, главным образом в конце цветения, высыпается из растрескавшихся пыльников (рис. 1, *b*) и в тестах на жизнеспособность хорошо окрашивается в карминовый цвет. В некоторых случаях у ЦМС Polima в отдельных пыльцевых мешочках наступало очень позднее разделение мужских археспор на материнские камеры вплоть до развития микроспор, однако эти мешочки не раскрывались до конца цветения (рис. 1, *c*). Мешочки частично стерильных растений, в отличие от фертильных, образуют меньшее количество зерен пыльцы.

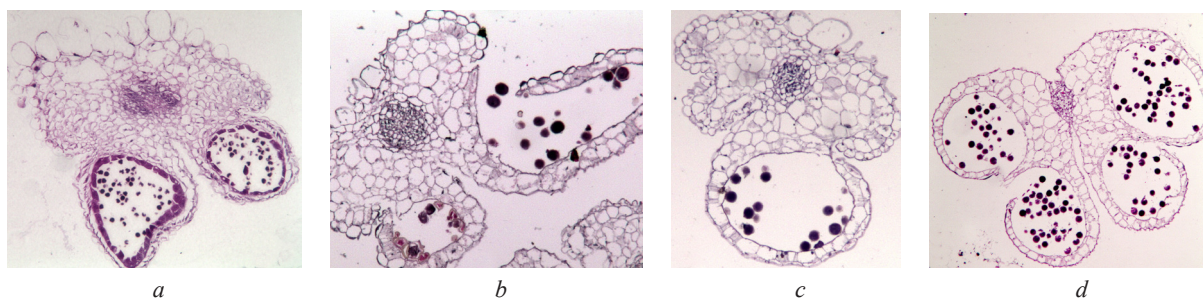


Рис. 1. Пыльники ЦМС Polima: *a* – бутон средний – 3–4 мм; *b*, *c* – только что распустившийся бутон; *d* – пыльник фертильного растения (распустившийся бутон)

Fig. 1. CMS pollinia Polima: *a* – medium bud – 3–4 mm; *b*, *c* – newly blossomed bud; *d* – fertile plant pollinium (blossomed bud)

При разрезе стерильных пыльников типа ЦМС Polima не были обнаружены дегенеративные ткани. Существует вероятность того, что при благоприятных температурных условиях может наступать дифференциация мужских археспор. Этот тип стерильности не является результатом полной блокировки образования пыльцы, а обуславливается отсутствием или запоздалым развитием мужских археспор, вызванным пороговым эффектом суммы или высоты температуры.

Пыльники стерильных растений ЦМС Ogura в разрезе под микроскопом выглядят совсем иначе, чем фертильные аналоги и стерильные растений ЦМС Polima. Ни в одной фазе развития пыльников внутри пыльцевых мешочков не было жизнеспособных зерен пыльцы. Пыльцевые мешочки наполнялись дегенерированной массой, вероятно, состоящей из дегенерированных микроспор и клеток тапетума, которые всегда отделяются, а затем также дегенерируют (рис. 2, *a*). На более поздних этапах развития пыльников дегенерированная масса постепенно исчезала, пыльцевые мешочки наполнялись воздухом, а стенки пыльников спадались (рис. 2, *b*). Таким образом, механизм, ответственный за стерильность ЦМС Ogura, обусловлен дегенерацией микроспор и тапетума.

Следовательно, по морфологическому строению цветка и гистологическим исследованиям пыльников у типов ЦМС Ogura и Polima, а также фертильных растений-аналогов можно достоверно ранжировать их между собой и проводить отбор на более ранних этапах селекционного процесса.

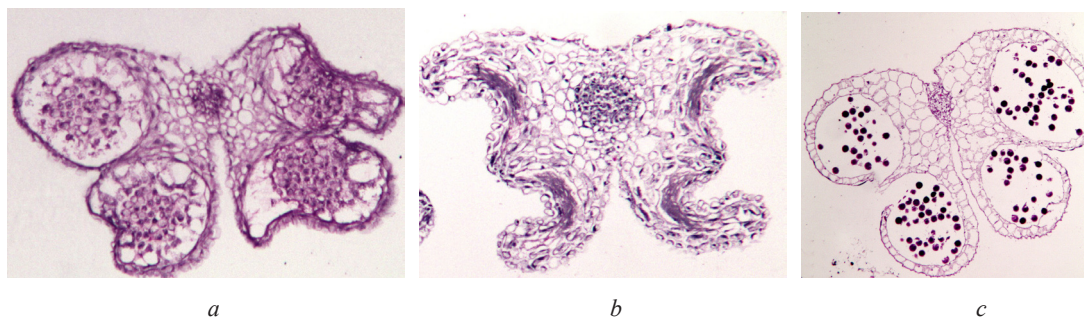


Рис. 2. Пыльники ЦМС Ogura: *a* – бутон средний – 3–4 мм; *b* – только что распустившийся бутон; *c* – пыльник фертильного растения (распустившийся бутон)

Fig. 2. CMS pollinia Ogura: *a* – medium bud – 3–4 mm; *b* – newly blossomed bud; *c* – fertile plant pollinium (blossomed bud)

Для оценки закрепляющей и восстанавливающей способности родительских линий в гетерозисной селекции постоянно проводится гибридизация линий с ЦМС типа Ogura и Polima озимого рапса, а также фенологические наблюдения и учеты.

Исследования показали, что перезимовка растений озимого рапса с ЦМС Ogura и Polima была высокой (от 87,5 до 100 %), существенно не отличалась от фертильных аналогов и изменялась от условий года.

Значительных изменений в продолжительности периодов вегетации родительских линий гибридов на стерильной и фертильной цитоплазме не установлено. У изученных линий период от всходов до цветения был практически одинаковым, за исключением стерильных растений линий А-5124/13 (ЦМС Ogura) и О-63/08 (ЦМС Polima), у которых цветение начиналось соответственно на 4 суток позднее и 5 суток раньше, чем у фертильных растений.

Высота растений рапса озимого – один из признаков, играющих важнейшую роль в устойчивости сорта или гибрида к засухе, полеганию и снижению потерь маслосемян при уборке, изменялась у родительских линий гибридов на стерильной и фертильной цитоплазме от 98,8 до 162,8 и от 131,6 до 151,4 см соответственно. Установлены небольшие положительные отличия по высоте растений между фертильными и стерильными аналогами с ЦМС Ogura (от –8 до 19,8 см), что находилось в пределах ошибки опыта и только у линий Zn-336/12 и 742-14-4 она была достоверна. У большинства изученных линий с использованием стерильной цитоплазмы ЦМС Polima наблюдалось значительное снижение высоты растений при инцухте.

При оценке продуктивности фертильных родительских линий озимого рапса в сравнении с их стерильными аналогами выявлено, что по урожайности семян они находятся в пределах ошибки опыта. Самая высокая продуктивность отмечена у мужскостерильной линии на основе ЦМС Ogura А-5124/13 (рис. 3).

Масса 1000 семян у большинства изученных линий на стерильной цитоплазме систем ЦМС Ogura и Polima варьировала от 4,26 до 6,10 г и оказалась ниже, чем у линий на фертильной цитоплазме, за исключением образца А-5124/13 (Polima), у которого масса 1000 семян существенно (на 8,0 %) была выше фертильного аналога.

При изучении влияния ЦМС Ogura и Polima на масличность семян (рис. 4) выявлено, что только у линий Zn-336/12 (Ogura) и К-42/03 (Polima) обнаружены существенные различия по этому признаку в пользу стерильных аналогов, у линий О-63/08 и Р-774 (Polima) масличность семян была существенно ниже фертильного аналога.

Установлено, что диаметр цветка у гаплоидов по сравнению с удвоенными гаплоидами уменьшился в 2,0 раза, длина пыльников – в 2,1 раза, длина и ширина лепестков – в 1,8 и 1,4 раза соответственно. При этом различия между дигаплоидами и диплоидами не были выявлены. Гомозиготные линии проанализированы по основным элементам архитектоники и структуры урожая. Высота полученных дигаплоидных линий составила 150–186 см, высота ветвления – 44–68 см, длина центральной кисти – 30–50 см, количество боковых ветвей – 7–11 шт., количество стручков на центральной кисти – 25–46 шт., на растении – 120–240 шт., семян в стручке – 15,3–22,0 шт. и масса 1000 семян – 5,40–5,80 г.

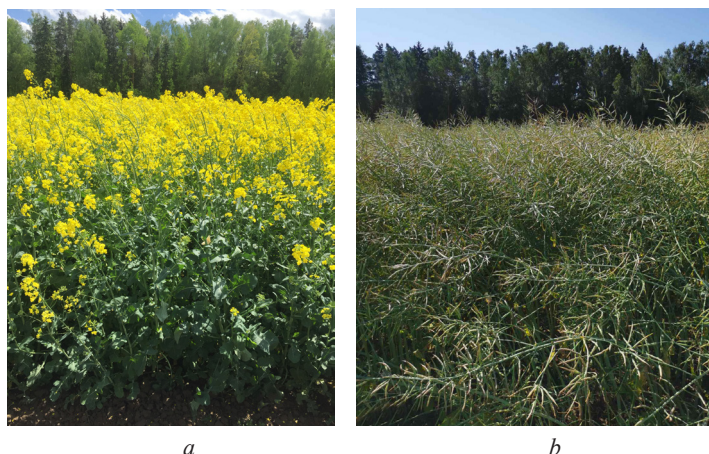


Рис. 3. Стерильная линия A-5124/13 на основе ЦМС Ogura: *a* – фаза цветения; *b* – фаза желто-зеленого стручка
 Fig. 3. Sterile line A-5124/13 based on CMS Ogura: *a* – flowering stage; *b* – yellow-green pod stage



Рис. 4. Масличность семян родительских линий озимого рапса с различным типом цитоплазмы, %
 Fig. 4. Oil content of seeds of winter rape parental lines with different types of cytoplasm, %

Оценка родительских линий озимого рапса на устойчивость к фомозу (*Phoma lingam*) путем искусственного заражения в условиях ФТК показала, что при сравнительном испытании линий на стерильной и фертильной цитоплазме не обнаружено отрицательного влияния стерильной цитоплазмы типа Ogura и Polima на устойчивость к патогену. Изученные линии обладали практически одинаковой устойчивостью к болезни, за исключением Zn-336/12 (ЦМС Ogura и Polima), у которых обнаружены существенные различия по этому признаку в пользу фертильного аналога. Практически все отечественные стерильные линии, за исключением O-63/08 (ЦМС Ogura), оказались устойчивее контроля (гибрид *ES Odis*) по этому признаку на 7,4–37,0 %. Фертильные родительские линии также показали высокую устойчивость к *Phoma lingam*, за исключением дигиплоидных гомозиготных линий № 4/1 и № 4/1-1, которые уступили контролю на 11,0–66,7 %.

Существенного различия в продолжительности периода всходы-бутонизация и бутонизация-цветение в селекции гибридов F₁ озимого рапса не выявлено, за исключением стерильного SL × Zn-336/12 и фертильного SL × 1/17-22, а также стерильных гибридов: SL × O-63/08 и SL × ЛИ-140 типа Ogura, у которых фазы «бутонизация» и «цветение» наступали соответственно на 4–5 суток позднее.

Для оценки генотипов озимого рапса по закрепляющей и восстанавливающей способности и отбора линий на основе ЦМС типа Polima и Ogura постоянно проводилась гибридизация (анализирующие, возвратные скрещивания, беккроссы) новых линий с источниками ЦМС. Практически все изучаемые образцы рапса являлись закрепителями стерильности для систем ЦМС Ogura и Polima, в оригинальном селекционном материале нами выделены линии с генами *Rf₁Rf₂*,

в различной степени восстанавливающие фертильность стерильных линий, которая изменялась в зависимости от системы ЦМС и генотипа от 45 до 100 %.

При оценке гибридов F_1 среди изучаемых образцов выделились 12 линий со 100 %-ной закрепляющей способностью для ЦМС Ogura, две линии для ЦМС типа Ogura и одна для типа Polima, имеющие 100 %-ную восстанавливающую способность.

При анализе источников закрепителей стерильности и восстановителей фертильности по биохимическим показателям качества семян установлено, что масличность семян источников закрепителей стерильности ЦМС типа Ogura и Polima находилась на уровне 41,8–49,7 %, а источников восстановителей фертильности типа Ogura и Polima – 42,8–44,0 %. Содержание глюкозинолатов у всех линий было в пределах нормы – от 13,3 мкМоль/г.

В полевых условиях также проведена оценка родительских линий на стерильной (типа Ogura и Polima) и фертильной цитоплазме на устойчивость к основным листовым болезням. У изучаемых образцов поражение болезнями при учете в фазу «конец цветения – формирование стручков», было низким, и только некоторые линии уступили контролю на 6,0–14,3 %.

По основным селекционно ценным признакам проведен анализ тестовых (восстановленных и простых стерильных) гибридов на основе ЦМС Polima и Ogura. Установлено, что у стерильных и фертильных гибридов на основе ЦМС Ogura число ветвей на растении (табл. 1) составило соответственно 7,5–10,0 и 7,0–11,8 шт., число стручков на растении 262,5–385,8 и 208,2–373,6 шт., количество семян в стручке 26,6–32,9 и 31,3–35,9 шт., масса 1000 семян 4,35–5,36 и 4,47–5,25 г, продуктивность 513–633 и 487–627 г/м². Эти же показатели у гибридов на основе ЦМС Polima варьировали следующим образом: 7,0–8,6 и 10 шт., 215,8–249,6 и 313,8 шт., 22,2–30,6 и 26,6 шт., 4,75–5,67 и 4,82 г, 487–627 и 500 г/м² соответственно. По комплексу признаков из простых стерильных гибридов на основе ЦМС Ogura и Polima выделились SL × S-d142-2-08, SL × Zn-336/12 и SL × 742-14-4 с максимальной продуктивностью 636, 627 и 627 г/м² соответственно.

Т а б л и ц а 1. Основные элементы структуры урожая (восстановленных и простых стерильных) экспериментальных гибридов F_1 на основе ЦМС Ogura и Polima

Table 1. Basic elements of the yield structure (restored and simple sterile) experimental F_1 hybrids based on CMS Ogura and Polima (under field conditions)

Название образца Name of the sample	Количество, шт. Quantity, pcs.			Масса 1000 семян, г 1000-grain weight, g	Продуктивность, г/м ² Productivity, g/m ²
	ветвей I порядка	стручков на растении	семян в стручке		
<i>Стерильные на основе ЦМС Ogura</i>					
SL × O-63/08	7,5	262,5	27,3	5,36	579
SL × Zn-336/12	8,4	272,0	28,1	4,93	627
SL × S-d142-2-08	10,0	385,8	32,9	5,20	513
SL × B-648/11	8,2	296,4	27,9	5,09	574
SL × ЛИ-140	8,8	266,4	27,3	4,85	514
SL × 742-14-4	8,5	272,3	26,6	4,65	636
Среднее	8,6	292,6	28,4	5,0	574
min–max	7,5–10,0	262,5–385,8	26,6–32,9	4,35–5,36	513–636
<i>Стерильные на основе ЦМС Polima</i>					
SL × O-63/08	7,5	215,8	28,5	5,08	569
SL × Zn-336/12	8,6	217,6	24,0	5,09	627
SL × S-d142-2-08	7,6	233,8	28,7	5,27	531
SL × B-648/11	7,0	220,4	30,6	5,33	583
SL × ЛИ-140	8,0	241,2	22,2	4,75	487
SL × 742-14-4	8,2	249,6	27,7	5,67	509
Среднее	7,8	229,7	27,0	5,20	551
min–max	7,0–8,6	215,8–249,6	22,2–30,6	4,75–5,67	487–627
<i>Фертильные на основе ЦМС Ogura</i>					
SL × 1/4-22	11,8	373,6	35,9	4,47	570
SL × 1/17-22	7,0	208,2	31,3	5,25	609
Среднее	9,4	290,9	33,6	4,90	590
min–max	7,0–11,8	208,2–373,6	31,3–35,9	4,47–5,25	570–609
<i>Фертильные на основе ЦМС Polima</i>					
SL × 223/20	10	313,8	26,6	4,82	500

Масличность у простых стерильных гибридов на основе ЦМС Ogura и их родительских линий варьировала от 42,8 до 46,9 % (в среднем – 44,0 %), на основе ЦМС Polima – от 41,6 до 46,6 % (43,5 %). Лучшими фертильными гибридами по этому признаку были SL × 1/4-22 (43,6 %) и SL × 223/20 (44,0 %). Содержание глюкозинолатов у всех гибридов находилось в пределах нормы – 14,7–24,0 мкМоль/г.

В процессе исследований были изучены и отобраны родительские линии (материнские) озимого рапса на основе ЦМС Ogura, отличающиеся повышенной устойчивостью к вредителям. Повреждение растений стручковым комариком находилось в пределах 5,6–8,4 %, стеблевым скрытнохоботником от 10 %. Среди анализируемых образцов выделилась линия 9-18/23р, у которой полностью отсутствовали признаки поражения бактериозом.

При анализе основных элементов структуры урожая стерильных аналогов самоопыленных линий озимого рапса (материнских форм) на основе ЦМС Ogura и Polima по основным селекционно ценным признакам выявлено, что число ветвей на растении у стерильных линий на основе ЦМС Ogura и Polima изменялось от 5,8 до 12,0 и 5,8 – 12,6 шт., количество стручков на растении от 213,8 до 372,0 и 191,0–359,6 шт., количество семян в стручке от 21,6 до 28,8 и 20,8 – 27,2 шт., масса 1000 семян от 5,62–6,38 и 5,48–6,48 г, продуктивность от 239,0 до 434,0 и 238,0–412,0 г/м². По комплексу признаков из простых стерильных линий на основе ЦМС Ogura и Polima выделились линии А-5124/13, 742-14-4 и S-d142-2-08, А-5124/13.

В селекции рапса наряду с классическими способами успешно применяют метод культуры *in vitro*, особенно гаплоидию [14]. Для рапса характерно явление прямого эмбриогенеза, при котором образование гаплоидного растения происходит из микроспор, развивающихся в эмбриоиды, а не в недифференцированный каллус [8; 14]. Частота эмбриогенеза у озимого рапса в культуре пыльников составляет около 1 %. Кроме того, имеются сортовые различия по данному признаку, поэтому необходимы большие объемы работ для получения достаточного количества эмбриогенных эксплантов. Известно, что холодовая предобработка незрелых бутонов при температуре +4–7 °С в течение нескольких суток синхронизирует клеточные деления и повышает выход эмбриогенных эксплантов [8]. Нашими исследованиями установлено, что холодовая предобработка донорных растений рапса озимого повышает выход эмбриоидов в 2–2,5 раза у большинства образцов (табл. 2, рис. 5, а).

У образцов, которые подвергались холодовой предобработке донорных растений, эмбриоды появились у всех номеров, включая даже генотипы с низкой эмбриогенной способностью (Х 2/20 – 0,16 % и Х 3/20 – 0,72 %). Максимальной эмбриогенной способностью обладал образец № 6/2 (31,9 %), высокой эмбриогенной способностью обладали также образцы Х 4/20 (14,2 %), Х 1/20 (9,4 %) и 2 (9,1 %). Все экспланты, полученные от растений рапса озимого без холодовой предобработки донорных растений, кроме образца Х 1/20 (2,1 %), не обладали эмбриогенной способностью.

Т а б л и ц а 2. Влияние холодовой предобработки донорных растений рапса озимого на эмбриогенную способность высаженных эксплантов

T a b l e 2. The effect of cold pretreatment of donor plants on embryogenic capacity of planted explants

Название образца Name of the sample	С холодовой предобработкой			Без холодовой предобработки		
	пыльников pollinia	эмбриоидов embryoids	эмбриоидов embryoids	пыльников pollinia	эмбриоидов embryoids	эмбриоидов embryoids
	шт.	шт.	%	шт.	шт.	%
Х 1/20	900	85	9,4	360	4	2,1
Х 2/20	630	1	0,16	–	–	–
Х 3/20	1854	14	0,75	–	–	–
№ 4/1	828	39	4,7	–	–	–
№ 6/2	522	167	31,9	252	0	0
№ 8	936	12	1,2	–	–	–
№ 2	594	54	9,1	–	–	–
№ 3/2	306	11	3,6	–	–	–
№ 13	180	4	2,2	–	–	–
Всего	7236	456	6,3	11448	52	0,45

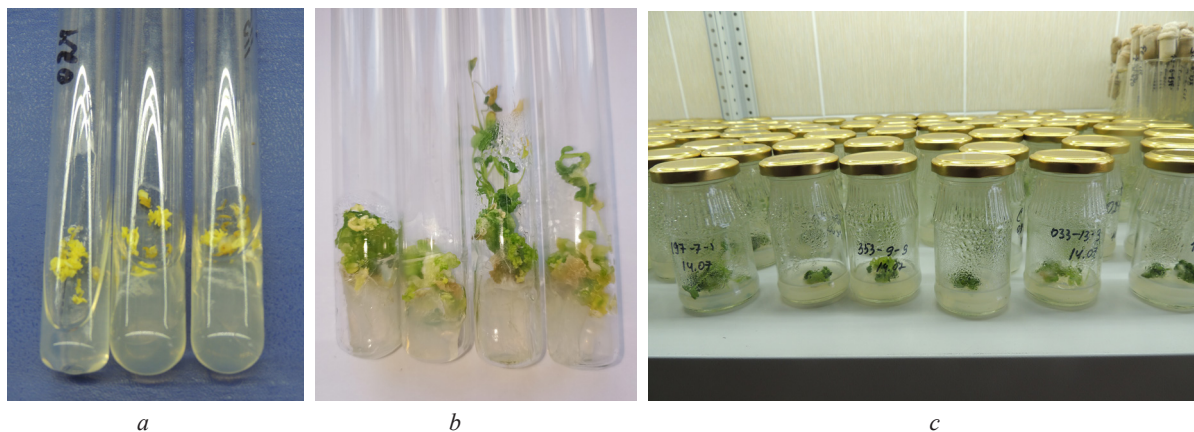


Рис. 5. Этапы получения дигаплоидов рапса в культуре *in vitro*: *a* – массовый эмбриоидогенез после холодной предобработки донорных растений; *b* – развитие эмбриоидов; *c* – микроклональное размножение озимого рапса

Fig. 5. Stages of obtaining rape dihaploids in *in vitro* culture: *a* – mass embryogenesis after cold pretreatment of donor plants; *b* – embryoids development; *c* – microclonal propagation of winter rape

На выход эмбриоидов кроме холодной предобработки большое влияние оказывает состав питательных сред. Различные концентрации 2,4-Д и НУК (1-нафтилуксусная кислота) обусловили значительные отличия в эмбриогенной способности высаженных эксплантов рапса. Количество образовавшихся эмбриоидов варьировало от 0 до 14,2 %, среднее значение данного показателя составило 3,4 %. На среде Б, с содержанием 2,4-Д – 0,5 мг/л и НУК – 0,25 мг/л эмбриогенная способность эксплантов снизилась более чем в 10 раз и среднее значение данного показателя составило 0,23 %. Таким образом, повышение концентрации гормонов роста не повлекло за собой увеличения числа образовавшихся эмбриоидов.

Анализ особенностей протекания онтогенетических процессов у полученных эмбриоидов рапса на среде для ризогенеза показал, что процессы регенерации и морфогенеза у высаженных эмбриоидов происходили с разной интенсивностью по 3 различным направлениям. У образцов Х2/20 и 1963618, № 8, характеризующихся незначительным количеством эмбриоидов, регенеранты сформировались уже при первом пассаже на ризогенной среде (табл. 3, рис. 5, *b*).

У большинства образцов рапса озимого вместо ризогенеза наблюдался процесс образования недифференцированного каллуса или на каллусных тканях, возникающих из эмбриоидов, появлялись вторичные эмбриониды, которые были вновь пересажены на ризогенную среду и из них развивались либо нормальные растения, либо каллусные ткани с эмбриоидами или без них. Таким образом, потребовалось несколько пассажей прежде, чем эмбриониды перешли в стадию ризогенеза и регенерации. В итоге вторичный или третичный эмбриоидогенез позволил образцам Х3/20, 171816418-2, 13, 171816418-1 повысить частоту возникновения регенерантов до 111–200 %. Третью группу образовывали эмбриониды, формирующие корневую систему, но с неразвитой точкой роста. Часть из них погибала, а у выживших эксплантов на стеблевой части регенеранта возникали вторичные эмбриониды, из которых удалось получить полноценные регенеранты. Всего было получено, проколхицинировано и высажено в искусственную почву Биона 213 регенерантов, из них выращено 132 хорошо сформированных растения.

Изучение каллусогенной и эмбриогенной способности источников ЦМС проводилось на 4 линиях озимого рапса, несущих гены цитоплазматической мужской стерильности, Х5/20, Х7/20, № 8, 19219. Для установления возможности микроклонального размножения стерильных форм озимого рапса незрелые пыльники данных образцов высаживались на искусственные питательные среды. Инициация каллусогенеза и получения первичного каллуса осуществлялась на среде Келлера–Армстронга.

Анализ полученных результатов показал, что у образцов Х5/20 и Х7/20 способность к эмбриоидогенезу у пыльников полностью отсутствует, № 8 и 19219 образовали незначительное количество эмбриоидов, выход которых составил 1,3 и 0,3 % соответственно. Способность к каллусогенезу выявлена у всех изученных образцов, лучшими по данному показателю были 19219 (2,6 %) и Х7/20 (1,9 %). У образца № 8 каллусогенная и эмбриогенная способность незрелых пыльников

Т а б л и ц а 3. Частота возникновения жизнеспособных регенерантов рапса озимого в зависимости от пассажа

T a b l e 3. Frequency of viable regenerants depending on passage

Название образца Name of the sample	Эмбрионов, шт. (%) Embryoids, pcs. (%)				Пригодных для колхичинирования, шт. (%) Suitable for colchicination, pcs. (%)
	Всего Total	Способных к регенерации Capable for regeneration			
		первичных primary	вторичных secondary	третичных tertiary	
X 1/20	88	4 (4,5 %)	17 (19,3 %)	6 (6,8 %)	27 (30,7 %)
X 2/20	1	1 (100 %)	–	–	–
X 3/20	14	5 (35,7 %)	1 (7,1 %)	16 (114,4 %)	22 (157,0 %)
X 4/20	69	11 (15,9 %)	8 (11,6 %)	1 (1,5 %)	20 (29,0 %)
X 8/20	13	–	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)	2 (16,7 %)
№ 2	52	10 (19,2 %)	4 (7,7 %)	21 (40,4 %)	35 (67,3 %)
№ 3/2	11	2 (18,2 %)	1 (9,1 %)	1 (9,1 %)	4 (36,4 %)
№ 4/1	39	5 (12,8 %)	1 (2,6 %)	6 (15,4 %)	12 (30,7 %)
№ 6/2	167	25 (15,0 %)	9 (5,4 %)	4 (2,4 %)	38 (22,8 %)
№ 8	12	10 (83,3 %)	–	–	11 (91,7 %)
№ 13	4	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	5 (125,0 %)
15161019	6	2 (33,3 %)	–	–	2 (33,3 %)
19219	4	3 (75,0 %)	–	1 (25,0 %)	4 (100,0 %)
171816418-1	9	2 (22,2 %)	6 (66,7 %)	2 (22,2 %)	10 (111,1 %)
171816418-2	5	2 (40,0 %)	6 (120,0 %)	2 (40,0 %)	10 (200,0 %)
182018122	13	6 (46,2 %)	3 (23,1 %)	2 (15,4 %)	11 (84,6 %)
Всего	508	91 (17,9 %)	58 (11,4 %)	64 (12,6 %)	213 (41,9 %)

находились практически на одном уровне. Для инициации каллусогенеза и получения первичного каллуса для прямой регенерации из гипокотилей и семядолей рапса при микроклональном размножении использовали модифицированную среду МС (рис. 5, с). При микроклональном размножении применяли 5 вариантов питательных сред на разных этапах биотехнологических работ. В качестве эксплантов были взяты семядоли и гипокотильные сегменты 4–6-дневных проростков рапса. Максимальное количество клонов было получено у образца № 14/5 – 224 шт. и № 13/19 – 54 шт. По мере развития регенерантов они пересаживались на регенерационную среду для формирования полноценных растений рапса с последующей адаптацией к условиям *ex vitro*. Всего было получено 43 жизнеспособных регенеранта, которые высажены на доращивание в ФТК, а затем в полевых условиях и внедрены в селекционный процесс.

В Национальный банк семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» передано: 5 гомозиготных линий, 12 линий с закрепляющей способностью для ЦМС типа Ogura, 5 стерильных аналогов самоопыленных линий.

Заключение. В работе представлены результаты изучения цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) рапса озимого (*Brassica napus ibernalis* L.) с использованием гистологических, морфобиологических и биохимических методов. Созданы при помощи культуры *in vitro* и оценены по комплексу хозяйственно полезных признаков и свойств новые формы и линии рапса для получения высокопродуктивных гетерозисных гибридов с улучшенными характеристиками. Выделено 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura; а также 2 линии для ЦМС Ogura и 1 для ЦМС Polima со 100 %-ной восстанавливающей способностью. В Национальный банк семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» передано: 5 гомозиготных линий, 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura, 5 стерильных аналогов самоопыленных линий. Проведена оценка комбинационной способности более 20 материнских родительских линий и получено свыше 500 экспериментальных простых стерильных и восстановленных гибридов на основе ЦМС типа Ogura.

Список использованных источников

1. Пилюк, Я. Э. Научные основы селекции и технологии возделывания рапса (*Brassica napus oleifera* Metzg.) в Беларуси / Я. Э. Пилюк. – Минск, 2021. – 80 с.
2. Fu, T. D. Discovery, study and utilisation of polima CMS in *Brassica napus* / T. D. Fu // Progr. Natl. Scien. – 1995. – N 5. – P. 169–177.

3. Горлов, С. Л. Селекция озимого рапса (*Brassica napus*) на гетерозис / С. Л. Горлов. – Краснодар, 1995. – 70 с.
4. Prakash, S. Cytoplasmic male sterility (CMS) systems either than ogu and polima in Brassica: current status / S. Prakash, P. B. Kirti, V. L. Chopra // 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK. – 1995. – Vol. 1. – P. 44–48.
5. Popławska, W. Genetic and breeding evaluation of doubled haploid lines with restorer gene for CMS ogura system of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) / W. Popławska, I. Bartkowiak-Broda, L. Szała // Brassica. – 2007. – Vol. 9, N 1–4. – P. 29–32.
6. Laser, K. D. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms / K. D. Laser, N. R. Lersten // Bot. Rev. – 1972. – Vol. 38. – P. 425–454. <https://doi.org/10.1007/bf02860010>
7. Kaul, M. L. H. Sterility in higher plants (Monographs on theoretical and applied genetics) / M. L. H. Kaul. – Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988. – 1005 p.
8. Котлярова, Е. Б. Аспекты применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.) / Е. Б. Котлярова. – Липецк, 2007. – 22 с.
9. Mishra, R. *In vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects / R. Mishra, G. J. N. Rao // Rice Sci. – 2016. – Vol. 23, N 2. – P. 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
10. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.
11. Методические указания по изучению мировой коллекции масличных культур / ВИР. – СПб., 1976. – 23 с.
12. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / под ред. М. А. Федина. – М., 1988. – 121 с.
13. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М., 1980. – 301 с.
14. Keller, W. A. High frequency of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures / W. A. Keller, K. C. Armstrong // Z. Pflanzen-zuchtg. – 1978. – Vol. 80. – P. 100–108.
15. Марченко, Л. Н. Качество масла и пути его улучшения в процессе селекции масличных крестоцветных / Л. Н. Марченко // Селекция и семеноводство масличных культур: сб. науч. работ / ВНИИМК. – Краснодар, 1980. – С. 107–114.

References

1. Piliuk Ya. E. *Scientific bases of breeding and technologies of rape cultivation (Brassica napus oleifera Metz.) in Belarus*. Minsk, 2021. 80 p. (in Russian).
2. Fu T. D. Discovery, study and utilisation of polima CMS in Brassica napus. *Progr. Natl. Scien*, 1995, no. 5, pp. 169–177.
3. Gorlov S. L. *Winter rape (Brassica napus) breeding for heterosis*. Krasnodar, 1995. 70 p. (in Russian).
4. Prakash S., Kirti P. B., Chopra V. L. Cytoplasmic male sterility (CMS) systems either than ogu and polima in Brassica: current status. *9th International Rapeseed Congress*. Cambridge, UK, 1995, vol. 1, pp. 44–48.
5. Popławska W., Bartkowiak-Broda I., Szała L. Genetic and breeding evaluation of doubled haploid lines with restorer gene for CMS ogura system of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Brassica*, 2007, vol. 9, no. 1–4, pp. 29–32.
6. Laser K. D., Lersten N. R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Botanical Review*, 1972, vol. 38, pp. 425–454. <https://doi.org/10.1007/bf02860010>
7. Kaul M. L. H. *Sterility in higher plants (Monographs on theoretical and applied genetics)*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988. 1005 p.
8. Kotlyarova E. B. *Aspects of application of biotechnology methods in spring rape breeding (Brassica napus L.)*. Lipetsk, 2007. 22 p. (in Russian).
9. Mishra R., Rao G. J. N. *In vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. *Rice Science*, 2016, vol. 23, no. 2, pp. 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
10. Dospikhov B. A. *Field experiment methodology*. Moscow, 1985. 351 p. (in Russian).
11. *Guidelines for the study of the world collection of oil crops*. Saint Petersburg, 1976. 23 p. (in Russian).
12. Fedin M. A., ed. *Methodology of state variety testing of crops*. Moscow, 1988. 121 p. (in Russian).
13. Pausheva Z. P. *Practical training in plant cytology*. Moscow, 1980. 301 p. (in Russian).
14. Keller W. A., Armstrong K. C. High frequency of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzen-zuchtg*, 1978, vol. 80, pp. 100–108.
15. Marchenko L. N. Oil quality and ways to improve it in the process of oil cruciferous breeding. *Seleksiya i semenovodstvo maslichnykh kul'tur: sbornik nauchnykh rabot* [Plant breeding and seed production of oil crops: collection of research works]. Krasnodar, 1980, pp. 107–114 (in Russian).

Информация об авторах

Пилиук Ядвига Эдвардовна – д-р с.-х. наук, профессор, заведующая отделом. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: iveya@list.ru.

Куликович Елена Николаевна – канд. с.-х. наук, вед. науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: enkulinkovich@mail.ru.

Бобко Наталья Николаевна – науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: bobko201@mail.ru.

Новичек Анна Александровна – науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: bart_an@mail.ru.

Information about the authors

Piliuk Yadviga E. – D. Sc. (Agrarian), Professor, Head of the Department. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: iveya@list.ru.

Kulinkovich Elena N. – Ph. D. (Agrarian), Leading Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: enkulinkovich@mail.ru.

Bobko Natalia N. – Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: bobko201@mail.ru.

Novichек Anna A. – Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: bart_an@mail.ru.