

ОСОБЕННОСТИ ЭТАПА ПРОБОПОДГОТОВКИ В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР *IN VITRO* РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО.

Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А.В. Солдатенко

Федеральный научный центр овощеводства, п. ВНИИССОК, Россия

Редис (*Raphanus sativus* L.) – перекрестноопыляемая, экономически значимая корнеплодная культура семейства Brassicaceae. Традиционно сорта редиса создаются с помощью скрещивания чистых линий, полученных путем длительного инбридинга. Для ускорения селекционного процесса в настоящее время применяются биотехнологические методы. Получение удвоенных гаплоидов (ДН-растений) в культуре микроспор *in vitro* является передовой технологией создания выровненного материала для селекции и генетических исследований. Особенно этот метод актуален для перекрестноопыляемых сельскохозяйственных культур, ввиду сокращения временных и экономических затрат в несколько раз по сравнению с традиционными методами селекции (Forster, Thomas, 2005; Ferrie, Möllers, 2011).

На данный момент клеточная технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* разработана (Lichter, 1982; Pechan, Keller, 1988; Dunwell, 2010) и активно применяется в селекционных программах многих культурных растений, но для ряда культур, в том числе для редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) она все еще не доступна.

Род *Raphanus sativus* L. является самым неотзывчивым к эмбриогенезу в семействе Brassicaceae и в литературе нет данных об успешном получении удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* для редиса европейского. На базе института ФГБНУ ФНЦО в лаборатории репродуктивной биотехнологии сельскохозяйственных растений впервые удалось завершить полный цикл получения ДН-растений редиса европейского (Kozar et al., 2020). Благодаря чему появилась возможность исследовать причины его низкой эмбриогенной способности и искать пути ее преодоления для разработки эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов этой культуры.

Протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* состоит из большого числа этапов, каждый из которых имеет большое влияние на конечный результат (Maluszynski et al., 2003; Forster et al., 2007; Turaev et al., 2009; Ferrie, Caswell, 2011). Одним из таких этапов является пробоподготовка. Для индуцирования эмбриогенеза подходят микроспоры на поздней вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития, которые способны переходить с гаметофитного пути развития на спорофитный (Pechan, Keller, 1988). На других стадиях развития микроспоры не изменяют свой путь развития и погибают при культивировании, выделяя токсины, что оказывает пагубное воздействие на развитие эмбриогенных структур (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015). Поэтому для успешного результата важна высокая доля содержания микроспор на стадиях, восприимчивых к индукции эмбриогенеза, введенных в культуру *in vitro*.

Ввиду высокой корреляции между линейным размером бутона и стадиями развития микроспор в них, при пробоподготовке производится рекогносцировочный анализ бутонов различной длины на предмет оценки концентрации в них микроспор на необходимых стадиях развития (Kozar et al., 2020). После чего определяется диапазон линейных размеров бутонов, подходящих для выделения из них микроспор для введения в культуру *in vitro*. Этот этап стандартен и достаточен для культур семейства Brassicaceae с уже разработанной технологией получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro*, поскольку в таких культурах присутствуют бутоны с высокой концентрацией (до 80 %) микроспор на оптимальных стадиях развития в диапазоне варьирования линейного размера бутонов около 1 мм (Bhatia et al., 2018).

Однако редис европейский отличается спорадическим развитием микроспор в бутонах, ввиду чего процент восприимчивых к эмбриогенезу микроспор в бутоне редко превышает 50 % и значительно снижается при изменении длины бутона уже на 0.3–0.5 мм. относительно оптимума (Kozar et al., 2020). Причем эти параметры нестабильны и могут отличаться даже в пределах индивидуальных растений, а также смещаться в большую сторону в процессе цветения. Это является одной из причин низкой отзывчивости микроспор редиса европейского к эмбриогенезу и усложняет процесс отбора бутонов. Поэтому стандартный процесс пробоподготовки в культуре микроспор *in vitro*, который используется в технологиях получения удвоенных гаплоидов в других культурах семейства Brassicaceae, для редиса европейского недостаточен и требует доработки.

Для решения поставленных вопросов в исследования были включены сорок сортообразцов редиса европейского отечественной и зарубежной селекции из коллекции лаборатории столовых корнеплодов ФГБНУ ФНЦО. Как показал сравнительный анализ достаточно широкого набора образцов, на данный момент наиболее эффективным способом максимизирования содержания необходимых стадий микроспор в препарате является введение в культуру микроспор из бутонов сразу нескольких фракций для каждого опыта с ранжированием длины бутонов шагом не более 0.3 мм. Это позволяет повысить вероятность попадания в нужную стадию развития микроспор в культуре. Также по литературным данным проблему фракционирования микроспор можно решить с помощью отработки техники градиентного центрифугирования в растворе перколлы, которая позволяет разделить микроспоры на фракции по стадиям развития еще до введения в культуру. В литературе описаны работы, в которых применялось градиентное центрифугирование для культур Brassicaceae (Takahata et al., 1993; Bhowmik, 2011), в том числе для разновидности китайского редиса (Takahata et al., 1996) и в настоящее время проводится работа по адаптации этой методики для редиса европейского. Предварительные исследования показали, что диапазон поиска эффективных концентраций перколлы для разделения микроспор редиса европейского можно сузить до диапазона 30–40 %.

Помимо погибших микроспор, загрязняющими и токсичными агентами являются любые другие органические элементы, попадающие в препарат при пробоподготовке. Для культур семейства Brassicaceae выделение микроспор производится путем их разбивки в бюксах с магнитами на магнитной мешалке (Домблдес и др., 2016), или путем сжатия бутонов поворотным движением с помощью поршня (Custers, 2003). При выделении микроспор редиса такими способами, в препарат попадает много органических остатков разрушенных соматических клеток за счет механического воздействия. Поскольку такие элементы меньше по размеру, чем микроспоры, при фильтрации полученной суспензии они не задерживаются нейлоновыми фильтрами и попадают в препарат, оказывая токсическое воздействие. Ввиду этого, общепринятые техники выделения микроспор для редиса европейского не подходили и требовалось усовершенствование этого этапа технологии. В результате многочисленных экспериментов, нам удалось разработать наиболее приемлемый способ выделения микроспор для редиса, который минимизирует попадание продуктов разрушения соматических клеток в препарат. Этот способ заключается в индивидуальном препарировании бутонов поперечным разрезом скальпеля, после чего половинки бутонов погружаются в стерильные пробирки с промывочной средой NLN-13 и взбалтываются на центрифуге-вортекс «Микроспин» FV-2400. При таком выделении микроспор элементы органических продуктов разрушенных соматических клеток в препаратах практически отсутствуют, что способствует улучшению условий для прохождения эмбриогенеза.

В результате проведенной работы удалось усовершенствовать этап пробоподготовки в культуре микроспор *in vitro* для редиса европейского. Разработанные технологические модификации позволяют продвинуться в разработке эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ
в рамках научного проекта № 19–316–90034**

ЛИТЕРАТУРА

- Домблдес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Н.А., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблдес А.С. Технология полу – чения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации). М.: ВНИИССОК, 2016.
- Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Бондарева Л.Л.. Совершенствование ДН-технологии получения удвоенных гаплоидов капусты брокколи. Селекция и семеноводство овощных культур. 2015; 46:601–608.
- Bhowmik P., Dirpaul J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput Brassica napus microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011; 106, 359–362. DOI 10.1007/s11240–010–9913–3.
- Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in ra – dish (*Raphanus sativus* L.) according to nutritional and environmental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011; 52(5):530–535. DOI 10.1007/s13580–011–0080–1.
- Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht. 2003; 185–193. DOI 10.1007/978–94–017–1293–4 29.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010; 8:377–424. DOI 10.1111/j. 1467–7652. 2009.00498.x.