

Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского

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

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», пос. ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия
 e-mail: koz.leno4ek@gmail.com; edomblides@mail.ru

Аннотация. В последние годы резко повысилась потребность рынка в увеличении производства сортов и гибридов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) для открытого и закрытого грунта, разнообразных по группам спелости, форме и окраске корнеплода. Поэтому важно расширять генетическое разнообразие и ускорять селекционный процесс. Технология получения удвоенных гаплоидов существенно сокращает время при создании гомозиготных константных родительских линий, для получения которых наиболее перспективен метод культуры микроспор *in vitro*. Нам впервые удалось осуществить полный цикл получения ДН-растений редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*, до включения материала в селекционный процесс. Подобраны: оптимальный размер бутонов, параметры теплового шока, среды для индукции и регенерации. Выявлено, что линейная длина бутонов с оптимальной стадией развития микроспор генотип-специфична. Так, для сортообразца Родос оптимальным является показатель 2.8–3.3 мм, а для сортообразца Тепличный Грибовский – 3.7–4.2 мм. Для большинства генотипов оптимален температурный шок 32 °С в течение 48 ч. Впервые для индукции эмбриогенеза использована модифицированная среда Мурасиге–Скуга и обнаружено существенное влияние взаимодействия факторов «генотип × среда» на индукцию эмбриогенеза. Для этапа регенерации растений из эмбриоидов рекомендуется добавление к среде 1 мг/л бензиламинопурина и 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты, укоренение микропобегов проводится на безгормональной среде. Анализ полученных растений-регенерантов методом подсчета хромосом и методом проточной цитометрии клеточных ядер показал, что 69 % растений имели диплоидный набор хромосом, 9 % – гаплоидный, 22 % – миксоплоидный и анеуплоидный. Семенное потомство удалось получить самоопылением из удвоенных гаплоидов и миксоплоидов, причем все растения R1 имели удвоенный набор хромосом. Это исследование является начальным этапом в разработке эффективной методики получения удвоенных гаплоидов редиса для применения в селекционном процессе. Ключевые слова: ДН-растения; *Raphanus sativus*; культура микроспор *in vitro*; факторы эмбриогенеза; регенерация в культуре *in vitro*; температурная обработка; андрогенез.

Для цитирования: Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592

Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish

E.V. Kozar , E.A. Domblides , A.V. Soldatenko

FSBSI "Federal Scientific Vegetable Center", VNIISOK, Odintsovo region, Moscow oblast, Russia
 e-mail: koz.leno4ek@gmail.com; edomblides@mail.ru

Abstract. Over the recent years the market demand for scaling up the production of European radish (*Raphanus sativus* L.) varieties and hybrids for open and protected production, varying in ripeness group, root shape and color, has drastically increased. Therefore, the expansion of genetic diversity and acceleration of the selection process are important. Doubled haploid technology considerably curtails the time required for creation of homozygous constant parental cell lines when *in vitro* microspore culture is used as the most promising method. For the first time, we were able to realize the full production cycle of DH plants of European radish by *in vitro* microspore culture up to inclusion of the produced material into the selection process. We have selected: preferable flower bud size, heat shock parameters, induction and regeneration media. It was revealed that the linear length on the flower buds with the best possible stage of microspore development is genotype-specific: the flower bud length 2.8–3.3 mm is optimal for accessions of Rhodes and 3.7–4.2 mm is optimal for accessions of Teplichny Gribovsky. Heat shock at 32 °C for 48 hours is the most suitable for most genotypes. For the first time Murashige and Skoog based culture medium has been used for embryogenesis induction, and a major dependence of embryogenesis induction on the genotype × medium interaction was found. At regeneration and tiller stage it is advisable to add 1 mg/mL of benzylaminopurine and 0.1 mg/L of gibberellic acid to the medium, and rotting of micro-sprouts is performed with the use of hormone-free medium. Analysis of the produced regenerant plants by chromosome count and cell nucleus flow cytometry showed that 69 % of plants have a diploid chromosome set, 9 % have a haploid chromosome set, and 22 % have mixoploids and aneu-

ploids chromosome sets. The seed progeny from doubled haploids and mixoploids were obtained by self-pollination, where all R1 plants had a doubled set of chromosomes. This study launches the development of an efficient method of radish doubled haploid production to be used in the selection process.

Key words: DH plants; *Raphanus sativus*; *in vitro* microspore culture; embryogenesis factors; regeneration from *in vitro* culture; heat treatment; androgenesis.

For citation: Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592

Введение

В современной селекции сельскохозяйственных культур приоритетным является создание гибридов F1, отличающихся от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Наиболее сложное, трудоемкое и продолжительное звено в этом процессе – выведение константных родительских линий, на создание которых уходит от 6 до 12 лет при использовании традиционных методов селекции. В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются ДН-технологии (Dunwell, 2010), что позволяет ускорить селекционный процесс по меньшей мере на три-четыре года (Ferrie, Möllers, 2011).

Основные методы получения гаплоидов и классификация методов рассмотрены в ряде обзоров (Maluszynski et al., 2003; Dunwell, 2010; Asif, 2013). Гаплоидные технологии расширяют спектр формообразовательного процесса, облегчают отбор полезных генов, способствуют обнаружению редких рецессивных аллелей, помогают создать уникальные формы и, таким образом, повышают эффективность практической селекции (Forster, Thomas, 2005). В крупнейших иностранных селекционных компаниях (Syngenta, Bayer и др.) производство удвоенных гаплоидов некоторых видов растений уже стало рутинным, необходимым этапом селекции; в России также достигнуты успехи в этой области по ряду зерновых (Игнатова, 2011) и овощных культур (Вюртц и др., 2017; Пивоваров и др., 2017). В ФГБНУ ФНЦО (ранее ВНИИССОК), отмечающем в 2020 г. столетний юбилей, с использованием удвоенных гаплоидов созданы гибриды основных овощных культур: капусты белокочанной, брокколи, перца сладкого, тыквы крупноплодной и др. (Domblides et al., 2017).

Удвоенные гаплоиды можно получить на основе андрогенеза (культура пыльников или культура микроспор), гиногенеза (культура неоплодотворенных семязпочек) и партеногенеза (опыление облученной/обработанной химическими веществами пыльцой или пыльцой отдаленных видов). Успех этих технологий определяется двумя процессами: индукцией эмбриогенеза из микроспор/гаплоидных клеток зародышевого мешка и регенерацией растений из эмбриоидов. На указанные процессы влияет множество факторов: условия выращивания донорных растений, генотип, стадия развития микроспор/клеток зародышевого мешка, предобработка бутонов и микроспор, питательные среды и условия культивирования (Ferrie, Caswell, 2011), в силу чего невозможно разработать универсальную методику для всех культур. Ее необходимо оптимизировать индивидуально для каждого вида и даже сорта. Клеточные технологии активно развиваются, тем

не менее в литературе представлено ограниченное число эффективных протоколов получения удвоенных гаплоидов овощных культур семейства Brassicaceae Burnett, часть из которых защищена патентами. Основная проблема – низкий выход ДН-растений, поэтому повышение эффективности методик очень важно и данному вопросу уделяют внимание во всем мире.

Ведущее место в селекционных программах по ускорению процесса создания высокопродуктивных гибридов и сортов сельскохозяйственных растений занимает культура микроспор *in vitro* (андрогенез). Изолированные микроспоры при определенных условиях (оптимальная комбинация условий культуры и стрессового воздействия) могут быть переведены с нормального гаметофитного пути развития на спорофитный, вследствие чего образуются эмбриоиды, переходящие в гаплоиды (Hs), удвоенные гаплоиды (ДН-растения), миксоплоиды и анеуплоиды. Отсутствие в культуре микроспор соматических тканей позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений (Домблидес и др., 2016).

Первые успешные исследования по культуре микроспор в семействе Brassicaceae проведены в начале 1980-х гг. (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой ДН-технологии для представителей рода *Brassica* L. (Pechan, Keller, 1988). Затем культуру микроспор стали применять для различных разновидностей капусты: капусты цветной (*B. oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), полу- и рыхлокочанной капусты (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongyloides*), капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) и белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), а также китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Lichter, 1989; Cao et al., 1990; Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Zhang et al., 2008; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012). Опубликованные протоколы для семейства Brassicaceae приведены в обзоре (Maluszynski et al., 2003). К сожалению, описанные в литературе экспериментальные подходы не всегда можно воспроизвести и отсутствие стандартных методик часто приводит к противоречивым результатам.

Редис европейский (*Raphanus sativus* L.) – корнеплодное растение семейства Капустные, одна из самых скороспелых и экономически значимых овощных культур. Эффективной методики получения удвоенных гаплоидов для редиса пока нет. Лишь в некоторых публикациях говорится о применении метода культуры микроспор *in vitro* для редиса (Takahata et al., 1996; Chun et al., 2011; Han et al., 2014, 2018; Tuncer, 2017). Тем не менее ни в одном из исследований не был завершен полный цикл получения ДН-растений в культуре микроспор редиса европейского.

Четких представлений об причинах трудности получения удвоенных гаплоидов редиса сейчас нет, и выявить их возможно только эмпирически.

Цель наших исследований – разработать технологию получения ДН-растений редиса европейского для включения полученного линейного материала в селекционный процесс с изучением и подробным описанием проблем на каждом этапе.

Материалы и методы

Материал исследования и условия выращивания донорных растений. В работе использованы 12 сортов образцов редиса европейского из коллекции лаборатории столовых корнеплодов ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФНЦО), Московская область:

Название сортаобразца	Происхождение
Марта	Nasco, Украина
Родос	Замен Маузер Кведлинбург, Германия
Тепличный Грибовский	ВНИИССОК, Россия
Корсар	«Гавриш», Россия
С/о 162 длинный розовый с белым кончиком	Япония
С/о 162 округлый красный	»
Stunchy red	»
Французский завтрак	«Аэлита», Россия
Ария	ВНИИССОК, Россия
Моховский	»
Розово-красный с белым кончиком (РБК)	»
Соната	»

Донорные растения выращивали в вегетационной камере с лампами досвечивания (Osram plantstar 600 W) при постоянном температурном режиме 19 °С, освещенности 9000 люкс и 16-часовом фотопериоде для стимуляции цветения.

Исследование стадий развития микроспор. Для изучения взаимосвязи между размером бутона и стадией развития микроспор проводили цитологические исследования. Визуализация микроспор и пыльцы выполнена с помощью методики дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) и микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия).

Индукция эмбриогенеза в культуре микроспор. За основу была взята методика, разработанная в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО для культуры микроспор семейства Brassicaceae (Домблидес и др., 2016) с различными вариантами сред: NLN-13 (Lichter, 1982) и Мурасиге–Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина для индукции эмбриогенеза. В опытах использовали реактивы компании SIGMA с маркировкой “plant cell culture tested”.

Температурная обработка проходила сразу после введения микроспор в культуру *in vitro* в термостате при 32 °С в течение одних-четырех суток. При этом использовались оптимальные среды для индукции эмбриогенеза, определенные в предыдущем опыте по индукции эмбриогенеза в культуре микроспор. Исследование оптимальной температурной обработки с варьированием по продолжитель-

ности температурного стресса проводилось для каждого индивидуального образца в пяти повторностях.

Получение растений-регенерантов. Эмбриониды на стадиях крупных глобул, а также сердечковидной и торпедовидной помещали в чашки Петри на безгормональную среду Мурасиге–Скуга (МС). Для прорастания эмбриониды переносили на среды: 1) МС с 2 % сахарозы, 0.1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 3.0 г/л фитогеля (Sigma, США); 2) МС с 2 % сахарозы, 1 мг/л БАП, 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК), 3.0 г/л фитогеля; 3) МС с 2 % сахарозы, 0.2 мг/л тиадизурона (N-фенил-N'-(1,2,3-тиадиазол-5-ил)мочевина) (ТДЗ). Образовавшиеся побеги и эмбриониды отделяли и переносили для укоренения на безгормональную среду МС с 2 % сахарозы и 3.0 г/л фитогеля, pH 5.8. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами, с фотопериодом 14 ч, освещенностью 2500 люкс, постоянной температурой 25 °С.

Выращивание растений-регенерантов. Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *in vivo*. Выращивали растения-регенеранты в тех же условиях климкамеры, что и донорные растения.

Определение плоидности растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер выполняли на базе лаборатории биоинженерии Алтайского государственного университета (Барнаул) при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH, Германия) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм.

Статистический анализ осуществлен в программе ANOVA: one way ANOVA, factorial ANOVA и тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Определение зависимости стадии развития микроспор и выхода эмбрионидов от размера бутонов

Исследования показали, что структура популяции микроспор в пыльниках бутонов редиса европейского очень неоднородна и представлена фракциями микроспор на разных стадиях развития. Это согласуется с данными других авторов (Takahata et al., 1996; Bhatia et al., 2018).

Считается, что микроспоры наиболее восприимчивы к внешним факторам и способны изменять путь развития на поздней вакуолизированной одноклеточной и ранней двухклеточной стадиях (Pechan, Keller, 1988). Поэтому важно максимально увеличить концентрацию этих стадий в культуре, для чего необходимо определить линейный размер бутонов, который содержит такие стадии развития микроспор и пыльцы в наибольшей концентрации. Нами проанализировано процентное содержание (доля) микроспор на восприимчивой стадии развития в бутонах разных размеров (от 2.5 до 6.0 мм) у четырех генотипов редиса, проявивших отзывчивость к эмбриогенезу (табл. 1).

Выявлено, что количество восприимчивых микроспор в бутонах редиса редко достигает 50 %. Для сравнения, в бутонах отзывчивых культур, например у *B. oleracea* var. *capitata* L., этот показатель достигает 80 % (Bhatia et

Таблица 1. Содержание микроспор (%) на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития в зависимости от длины бутона редиса европейского

Генотип	Длина бутона, мм						
	2.5–3.0	3.0–3.5	3.5–4.0	4.0–4.5	4.5–5.0	5.0–5.5	5.5–6.0
Родос	38.2±5.6 ^{cd}	43.7±4.8 ^d	25.1±3.2 ^c	17.3±2.1 ^b	15.8±3.4 ^b	12.6±4.2 ^a	10.4±5.1 ^a
Тепличный Грибовский	29.8±2.3 ^b	38.2±5.1 ^c	46.8±4.0 ^d	40.5±2.7 ^c	27.2±3.5 ^b	21.4±6.2 ^{ab}	18.5±3.9 ^a
Моховский	28.1±4.2 ^b	51.2±2.4 ^c	30.3±3.7 ^b	25.2±3.5 ^b	19.9±2.7 ^a	18.7±1.9 ^a	18.9±3.2 ^a
РБК	29.1±3.3 ^c	44.2±2.9 ^d	43.7±3.1 ^d	28.6±4.6 ^c	20.1±3.8 ^{ab}	17.6±4.1 ^a	16.8±3.7 ^a

Примечание. Значения с одинаковыми буквами существенно не различаются при $p < 0.05$.

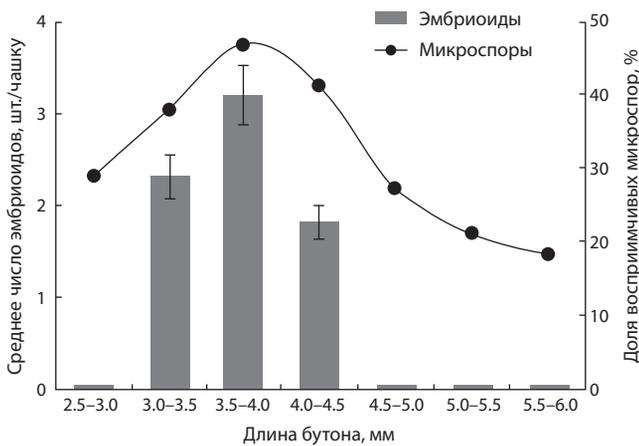


Рис. 1. Зависимость образования эмбриоидов от размера бутона и процентного содержания микроспор на восприимчивой стадии развития сортообразца редиса европейского Тепличный Грибовский (среднее значение и варьирование по повторностям).

al., 2018). При этом оптимальные размеры бутонов, с точки зрения отзывчивости микроспор к индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro*, существенно различаются у разных генотипов редиса.

Чтобы выявить значимость качественного состава изолированных микроспор для индукции эмбриогенеза, мы провели оценку выхода эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro*, изолируя микроспоры из бутонов различных размеров на примере сортообразца Тепличный Грибовский (рис. 1). Опыт был заложен в пятикратной повторности: отбирали бутоны размером от 2.5 до 6 мм с шагом 0.5 мм, затем микроспоры инкубировали на стандартной среде NLN-13 (Lichter, 1982) с 13 % сахарозы, pH 5.8.

В результате выполненного опыта подтверждено, что при размерах бутонов, в которых содержится наибольшее количество микроспор на восприимчивой стадии (44–51 % в зависимости от генотипа), выход эмбриоидов максимален. При уменьшении содержания восприимчивых микроспор на 6–8 % наблюдается резкое снижение выхода эмбриоидов, а при снижении этого показателя ниже 30 % образования эмбриоидов не происходит, независимо от размера бутонов.

Аналогичные результаты получены и в случае других сортообразцов редиса. Для каждого изученного генотипа редиса европейского был подобран наиболее оптималь-

ный размер бутонов для индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

Влияние состава питательной среды и длительности термообработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса

Переход на спорофитный путь развития не происходит самопроизвольно, поэтому необходимо создать оптимальные условия, среди которых наибольшее значение имеют: температурная обработка, условия культивирования и состав питательных сред для индукции эмбриогенеза. В наших опытах подбор питательных сред проводился на основе литературных данных. Так, для индукции эмбриогенеза растений семейства Brassicaceae обычно используют среды NLN-13 (Lichter, 1982; Chun et al., 2011; Han et al., 2014) или 1/2 NLN-13 (Takahata et al., 1996; Tuncer, 2017; Han et al., 2018), в состав которых входят аминокислоты глутамин и серин, оказывающие положительное влияние на эмбриогенез. Известно также, что большую роль в стимуляции соматического эмбриогенеза в суспензионной культуре играет гидролизат казеина, который представляет собой смесь различных аминокислот и используется в питательных средах у моркови столовой (Masuda et al., 1981; Вюртц и др., 2017). Ввиду этого мы решили впервые применить среду МС с добавлением гидролизата казеина в культуре микроспор *in vitro* для редиса.

В наших экспериментах ни у одного из изученных генотипов при использовании среды 1/2 нормы макроэлементов NLN-13 эмбриоидов не образовалось, поэтому в последующих экспериментах данная среда не применялась. При инкубировании микроспор редиса на стандартной среде NLN-13 и МС с гидролизатом казеина процесс эмбриогенеза удалось индуцировать у четырех сортообразцов из двенадцати (табл. 2).

Применение сред NLN-13 и МС с гидролизатом казеина показало четко выраженную генотип-специфическую отзывчивость индукции эмбриогенеза у культуры редиса на состав среды, которая в основном определялась взаимодействием двух факторов «генотип × среда» с долей влияния в данном опыте более 50 % (рис. 2).

Так, у сортообразца Родос получить эмбриоиды на стандартной среде NLN-13 не удалось, а на среде МС с гидролизатом казеина их выход достиг шести эмбриоидов на чашку Петри. Для сортообразца Тепличный Грибовский эта среда тоже оказалась более подходящей: максимальный выход – восемь эмбриоидов на чашку Петри.

Таблица 2. Влияние состава питательных сред на эмбриогенез (выход эмбриоидов) в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского

Генотип (сортообразец)	NLN-13		МС + 500 мг/л гидролизата казеина	
	Количество эмбриоидов, шт./1 чашку Петри			
	среднее	максимальное	среднее	максимальное
Родос	0	0	3.8 ± 0.6	6
Тепличный Грибовский	2.4 ± 0.5	4	4.6 ± 1.0	8
Моховский	1.8 ± 0.4	3	1.0 ± 0.3	2
РБК	4.4 ± 1.0	8	0	0

Примечание. Достоверность отличий: фактор А (сорт) – $F_{\text{факт}} 4.2 > F_{\text{теор}} 2.9$; фактор В (среда) – $F_{\text{факт}} 0.2 < F_{\text{теор}} 4.1$; взаимодействие А × В – $F_{\text{факт}} 17.1 > F_{\text{теор}} 2.9$.

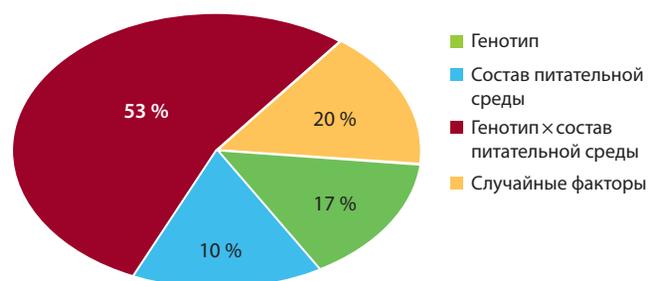


Рис. 2. Влияние факторов «генотип», «состав питательной среды» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*.

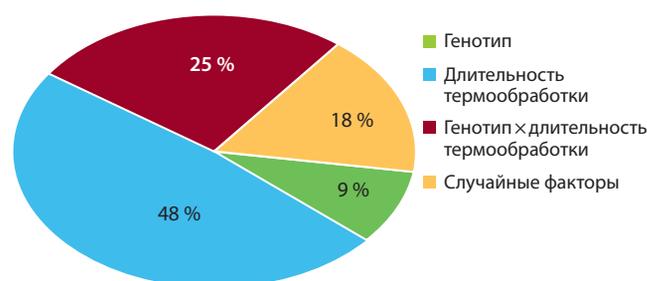


Рис. 4. Влияние факторов «генотип», «длительность термообработки» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*.

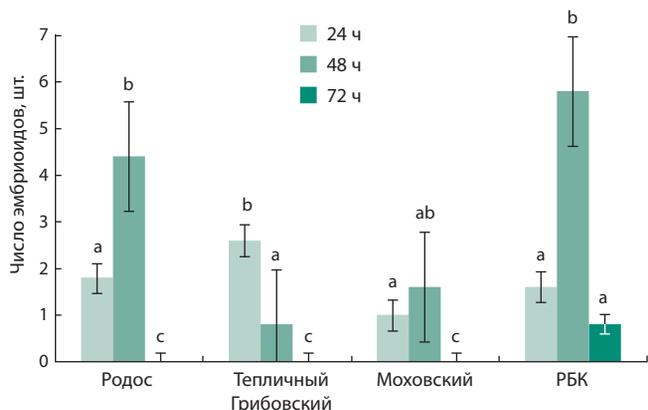


Рис. 3. Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С на образование эмбриоидов в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского.

Достоверность отличий: фактор А (сорт) – $F_{\text{факт}} 11.1 > F_{\text{теор}} 2.7$; фактор В (длительность термообработки) – $F_{\text{факт}} 58.9 > F_{\text{теор}} 2.8$; взаимодействие А × В – $F_{\text{факт}} 9.8 > F_{\text{теор}} 2.0$.

У сортообразцов Моховский и РБК лучшие результаты были получены на стандартной среде NLN-13: максимальный выход составил три и восемь эмбриоидов на чашку Петри соответственно.

Чтобы инициировать процесс переключения микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный, на них оказывают стрессовое воздействие повышенной температурой. При этом изолированные микроспоры либо останавливаются в своем развитии и погибают, либо продолжают развиваться по гаметофитному пути. Темпера-

турный стресс применяется на стадии, предшествующей первому гаплоидному митозу, или во время него, что, как правило, происходит в первые восемь часов после введения микроспор в культуру, поэтому они считаются критическими. Подбирая оптимальный режим для каждого индивидуального образца, мы проанализировали влияние на эмбриогенез температурной обработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С в течение одних-четырех суток сразу после начала культивирования (рис. 3).

Так, для сортообразцов Родос, Моховский и РБК оптимальной была термообработка продолжительностью двое суток, а для сортообразца Тепличный Грибовский – одни сутки. Инкубация эмбриоидов в течение трех суток существенно замедляла скорость развития эмбриоидов у сортообразца РБК и приводила к полному их отсутствию у остальных сортообразцов. При увеличении времени температурной обработки до четырех суток ни у одного генотипа образования эмбриоидов не происходило.

Внутри каждого генотипа влияние эффекта длительности термообработки на выход эмбриоидов было высокозначимым и составило 48 %, а сортовая специфичность была отмечена за счет взаимодействия факторов (25 %) «генотип × длительность термообработки» (рис. 4).

На примере сортообразца редиса европейского «Розово-красный с белым кончиком» (РБК) показаны наиболее наглядные результаты формирования эмбриоидов внутри одного сортообразца в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от продолжительности температурного стресса (рис. 5). В данном варианте при обработке в течение одних суток максимальный выход достигал трех эмбриоидов на чашку Петри, при экспозиции двое суток

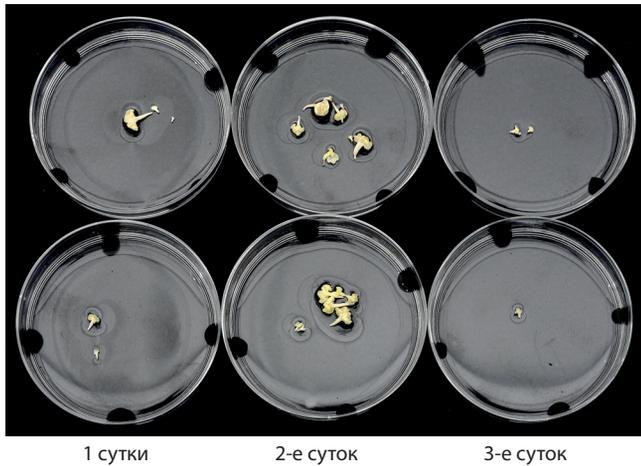


Рис. 5. Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С на эмбриогенез (выход эмбрионидов) в культуре микроспор у сортообразца редиса европейского РБК в среде NLN-13.

составлял до восьми хорошо развитых эмбрионидов, а в течение трех суток – до двух слаборазвитых эмбрионидов на чашку Петри.

Разработка схемы регенерации эмбрионидов, полученных в культуре микроспор *in vitro*

После этапа культивирования на индукционных жидких средах эмбриониды переносили на твердые питательные среды для регенерации. Прямое прорастания эмбрионидов в растения-регенеранты не происходило, поэтому на начальном этапе было необходимо запустить процесс вторичного эмбриогенеза и формирования вторичных точек роста с последующим побегообразованием (Шумилина и др., 2015; Домблидес и др., 2016). Иногда вторичные эмбриониды и точки роста образовывались на безгормональной среде, но использование различных экзогенных регуляторов роста оказывает дополнительную стимуляцию на морфогенез. В нашем эксперименте применялись следующие твердые питательные среды: МС безгормональная, МС с 1 мг/л БАП; МС с 0.2 мг/л ТДЗ; МС с 0.1 мг/л ГК и 1 мг/л БАП.

Частота образования вторичных точек роста и эмбриогенеза с последующим побегообразованием варьировала от 30 до 80 % в зависимости от генотипа и состава питательной среды. У большинства сортообразцов лучшие результаты (от 69 до 80 %) были получены на средах с совместным добавлением БАП и ГК. Исключение составил сортообразец Тепличный Грибовский, где лучший результат (до 63 %) был получен на среде с добавлением БАП (рис. 6).

Включение в состав среды тиадизурина дало отрицательный эффект, хотя в некоторых статьях описаны успешные опыты по регенерации на среде МС с добавлением 0.8 % агара, 3 % сахарозы, 0.2 мг/л ТДЗ (Бунин, Шмыкова, 2004). В нашем опыте все эмбриониды, пересаженные на эту среду, темнели и останавливались в своем развитии в течение трех-пяти суток.

В связи с отсутствием прямого эмбриогенеза сформированным побегам и почкам требуется отдельный этап

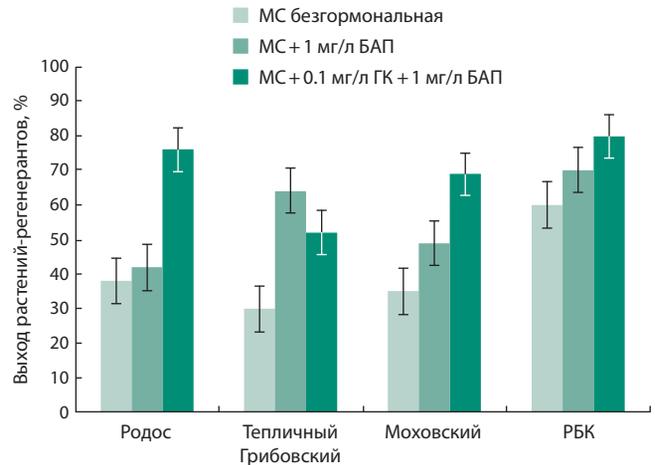


Рис. 6. Выход растений-регенерантов редиса европейского на первом этапе регенерации в зависимости от состава питательной среды и генотипа.

укоренения. Для этого сформированные почки и побеги переносили на твердую безгормональную среду МС. Образование нормально развитой корневой системы наблюдалось редко. У большинства эмбрионидов начинала утолщаться нижняя часть гипокотилия, формируя каллусные структуры с плохо развитыми корнями; такие растения плохо приживались в условиях *in vivo*.

Анализ полученных растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер показал, что 69 % растений были удвоенными гаплоидами, 9 % – гаплоидами, 22 % – миксо- и анеуплоидами. У удвоенных гаплоидов и некоторых миксоплоидов самоопылением было получено семенное потомство, в котором все растения R1 имели диплоидный набор хромосом ($2n = 2c = 18$).

Заключение

Смена пути развития микроспор зависит от множества факторов, степень влияния каждого из которых у разных культур может существенно различаться.

Для редиса европейского одним из важнейших факторов является стадия развития микроспор в бутонах. Показано, что линейный размер бутонов, содержащих максимальную концентрацию микроспор на восприимчивой к эмбриогенезу стадии развития, генотип-специфичен. Ввиду этого необходимо проводить рекогносцировочное определение оптимального размера бутонов путем изучения качественного состава микроспор в бутонах различной длины у каждого отдельного генотипа.

В культуре редиса европейского установлена также выраженная генотип-специфическая отзывчивость к эмбриогенезу и обнаружено влияние состава среды на интенсивность эмбриогенеза с высокой степенью взаимодействия этих факторов. Поэтому следует тестировать различные индукционные среды для каждого сортообразца. Так, у сортообразца РБК эмбриогенез индуцировался только на стандартной среде NLN-13 (Lichter, 1982), дополненной активированным углем, которая рекомендована для видов рода *Brassica* L. (Домблидес и др., 2016), а у сортообразца Родос – на среде МС с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидро-

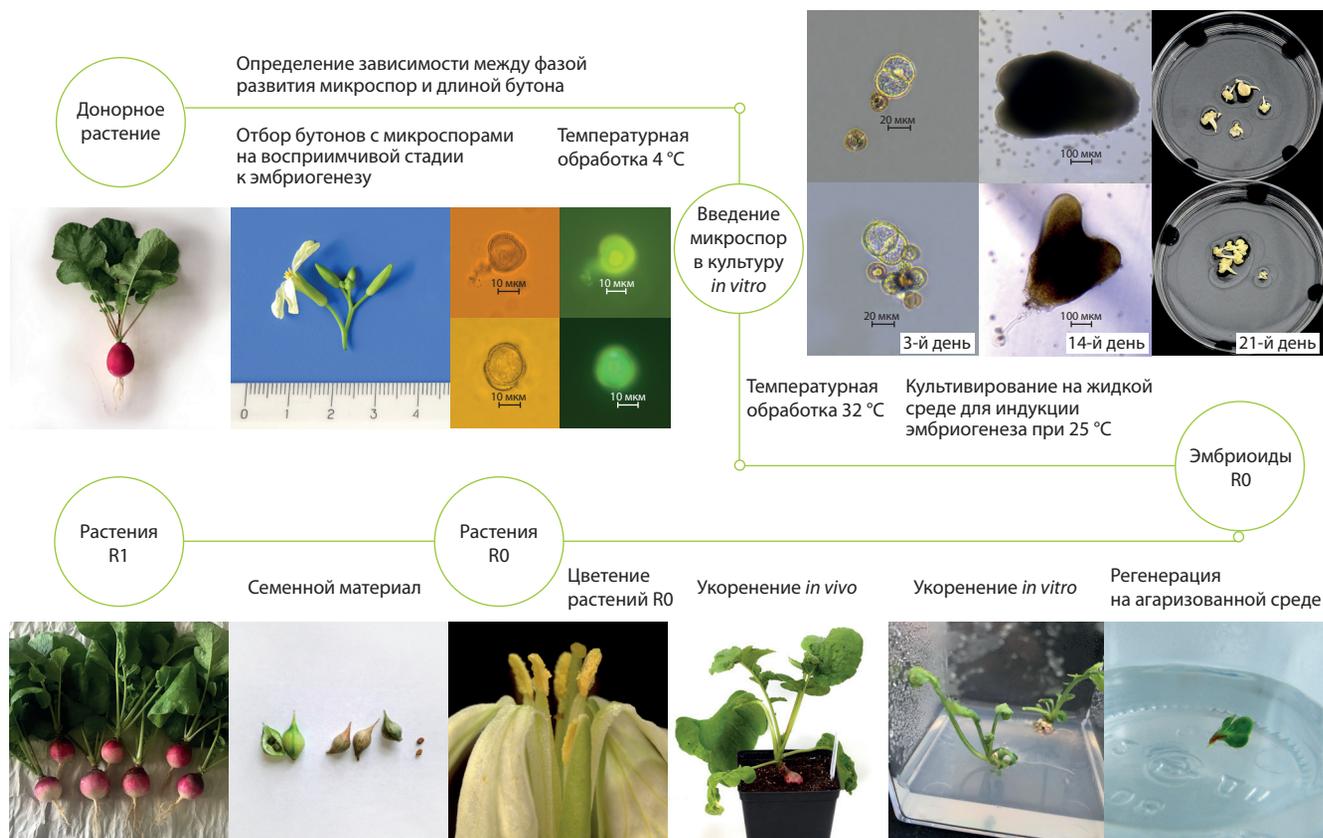


Рис. 7. Полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре микроспор *in vitro* на примере сортообразца РБК (Розово-красный с белым кончиком).

лизата казеина, используемой в корнеплодных культурах рода *Daucus* L. У других сортообразцов эмбриогенез наблюдали на обеих средах, но с различным выходом эмбрионидов: у сортообразца Тепличный Грибовский выход был выше на среде МС с гидролизатом казеина – до 8 эмбрионидов на чашку Петри (160 эмбрионидов/100 бутонов), у сортообразца Моховский самый высокий выход получен на среде NLN-13 – до 3 эмбрионидов на чашку Петри (60 эмбрионидов/100 бутонов).

Влияние продолжительности теплового шока 32 °С на индукцию эмбриогенеза также генотип-специфично. Однако при использовании оптимально подобранной среды для каждого сортообразца наблюдается общая тенденция влияния длительности термообработки. В большинстве случаев оптимален температурный шок в течение 48 ч. Инкубация микроспор более двух суток приводит к замедлению скорости развития эмбрионидов, а увеличение времени температурной обработки до четырех суток – к полному ингибированию процесса, т. е. поиск оптимума продолжительности теплового шока разных генотипов редиса можно сузить до одних-двух суток.

Несмотря на оптимизацию отдельных элементов технологии (размер бутонов, состав среды и продолжительность термообработки), выход эмбрионидов у отзывчивых генотипов редиса европейского был достаточно низким и не превысил 160 шт. на 100 бутонов. Одна из причин – неравномерное развитие микроспор в бутонах, что изначально ограничивает потенциал множественного образования

эмбрионидов ввиду низкой доли микроспор, способных к эмбриогенезу ($\leq 51.2\%$). Не переключившиеся на спорофитный путь развития микроспоры погибают, что влечет за собой образование токсинов и изменение pH среды (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015), препятствуя нормальному развитию эмбрионидов. В литературе имеются данные о добавлении в индукционную среду различных адсорбентов токсинов (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015) и буферных соединений, стабилизирующих уровень pH. Однако при использовании различных добавок возникает проблема адсорбции из среды вместе с токсинами необходимых веществ для эмбриогенеза. Поэтому требуется найти способ эффективного разделения популяции микроспор на фракции по стадиям развития еще до введения их в культуру *in vitro*.

На этапах регенерации и укоренения ДН-растений в культуре редиса европейского выявлено, что запустить и стабилизировать процессы вторичного эмбриогенеза можно с помощью регуляторов роста. Но важно учитывать, что направленность и эффективность действия некоторых из них могут существенно отличаться от результатов, ранее приведенных в литературе (Бунин, Шмыкова, 2004). Так, в наших опытах лучшие положительные результаты были получены при совместном внесении в среду МС регуляторов роста БАП и ГК, а добавление ТДЗ привело к отрицательному эффекту.

На этапе корнеобразования и укоренения были наибольшие потери растений-регенерантов. В силу биологических

особенностей развития редис очень чувствителен к повреждению точки роста главного корня. То есть помимо состава питательной среды необходимо усовершенствовать элементы техники переноса эмбриоидов на твердую питательную среду и приемы высадки растений-регенерантов в почву. Также следует отметить преимущество получения растений путем вторичного эмбриогенеза, поскольку из каждого эмбриоида можно получить несколько растений редиса, и в данном случае чаще происходит спонтанное удвоение хромосом, что позволяет уже в первом поколении провести их более полную оценку и собрать большее количество семян.

Растения-регенеранты, образованные при использовании культуры *in vitro*, были разнообразны по уровню плоидности. Большая часть растений относилась к удвоенным гаплоидам, одна пятая часть была представлена миксо- и анеуплоидами, причем некоторые миксоплоиды оказались фертильными и завязывали семена. Более того, все имбредное потомство (R1) миксоплоидных форм перешло в диплоидную форму. То есть в культуре редиса европейского миксоплоидные растения могут тоже представлять ценность и использоваться в селекционном процессе. Все семенное потомство включено в селекционный процесс, осуществляемый под руководством лаборатории корнеплодных культур (ФБНУ ФНЦО).

Таким образом, нам впервые удалось завершить полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса в культуре микроспор *in vitro* (рис. 7), выявить основные проблемы на разных этапах этой технологии и обозначить направление дальнейших исследований для разработки методики создания DH-растений с высокой эффективностью.

Список литературы / References

Бунин М.С., Шмыкова Н.А. Использование биотехнологических методов для получения исходного материала капусты. М.: Росинформагротех, 2004.
[Bunin M.S., Shmykova N.A. The Use of Biotechnological Methods to Obtain the Source Material of Cabbage. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2004. (in Russian)]

Вюртц Т.С., Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Федорова М.И., Кан Л.Ю., Домблидес А.С. Получение DH-растений в культуре микроспор моркови. Овощи России. 2017;5(38):25-30. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-25-30.
[Vjurtts T.S., Domblides E.A., Shmykova N.A., Fedorova M.I., Kan L.Ju., Domblides A.S. Production of DH-plants in culture of isolated microspore in carrot. Ovoshchi Rossii = Vegetables of Russia. 2017;5(38):25-30. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-25-30. (in Russian)]

Домблидес 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., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации). М.: ВНИИССОК, 2016.
[Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina N.A., Zayachkovskaya T.V., Mineykina A.I., Kozar E.V., Ahramenko V.A., Shevchenko L.L., Kan L.Ju., Bondareva L.L., Domblides A.S. A technology for obtaining doubled haploids in microspore cultures of the Brassicaceae family (guidelines). Moscow: VNISSOK Publ., 2016. (in Russian)]

Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.

[Ignatova S.A. Cell Technologies in Crop Production, Genetics and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]

Пивоваров В.Ф., Бондарева Л.Л., Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Минейкина А.И. Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов. С.-х. биология. 2017;52:143-151. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.143rus.
[Pivovarov V.F., Bondareva L.L., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Mineykina A.I. New generation hybrids of white cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) based on doubled haploids. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52:143-151. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.143eng.]

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Бондарева Л.Л., Заблочкая Е.А. Совершенствование DH-технологии получения удвоенных гаплоидов капусты брокколи. Селекция и семеноводство овощных культур. 2015;46:601-608.
[Shmykova N.A., Shumilina D.V., Bondareva L.L., Zablotskaya E.A. Improvement of DH-technology of development of double haploid plants of broccoli. Seleksiya i Semenovodstvo Ovoshchnykh Kul'tur = Selection and Seed Farming of Vegetable Crops. 2015;46:601-608. (in Russian)]

Шумилина Д.В., Шмыкова Н.А., Бондарева Л.Л., Супрунова Т.П. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор китайской капусты *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Ласточка. Изв. РАН. Сер. биол. 2015;4:368-375. DOI 10.7868/S000233291504013X.
[Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P. Effect of genotype and medium culture content on microspore-derived embryo formation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) cv. Lastochka. Biology Bulletin. 2015;42:302-309. DOI 10.1134/S1062359015040135.]

Alexander M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Technol. 1969;44(3):117-122. DOI 10.3109/10520296909063335.

Asif M. Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production. Springer, 2013. DOI 10.1007/978-3-319-00732-8_1.

Bhatia R., Dey S.S., Parkash C., Sharma K., Sood S., Kumar R. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India. Sci. Hortic. (Amsterdam). 2018;233:178-187. DOI 10.1016/j.scienta.2018.01.017.

Cao M.Q., Charlot F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) via *in vitro* isolated microspore culture. C.R. Acad. Sci. Paris. 1990;310:203-209.

Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to nutritional and environmental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011;52(5):530-535. DOI 10.1007/s13580-011-0080-1.

Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Domblides A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. In: VIII Int. Sci. Agric. Symp. "Agrosym 2017", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, Oct. 2017: Book of Proceedings. 2017;452-460.

Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica. 1992;60:45-55. DOI 10.1007/BF00022257.

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.

Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011;104:301-309. DOI 10.1007/s11240-010-9800-y.

- Ferrie A.M.R., Möllers C. Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:375-386. DOI 10.1007/s11240-010-9831-4.
- Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: Janick J. (Ed.). *Plant Breeding Reviews*. Vol. 25. John Wiley & Sons, 2005;57-88.
- Han N., Kim S.U., Park H.Y., Na H. Microspore-derived embryo formation and morphological changes during the isolated microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2014;32(3):382-389. DOI 10.7235/hort.2014.13170.
- Han N., Na H., Kim J. Identification and variation of major aliphatic glucosinolates in doubled haploid lines of radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2018;36(2):302-311. DOI 10.12972/kjhst.20180030.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982;105:427-434. DOI 10.1016/S0044-328X(82)80040-8.
- Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breed.* 1989;103(2):119-123. DOI 10.1111/j.1439-0523.1989.tb00359.x.
- Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Springer Science+Business Media, 2003. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4.
- Masuda K., Kikuta Y., Okazawa Y.A. Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ., Jpn.* 1981;60(3):183-193.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and big assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 1988;74(2):377-384. DOI 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x.
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 1991;74:235-242. DOI 10.1016/0168-9452(91)90051-9.
- Takahata Y., Komatsu H., Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 1996;16(3-4):163-166. DOI 10.1007/BF01890859.
- Tuncer B. Callus formation from isolated microspore culture in radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Anim. Plant Sci.* 2017;27(1):277-282.
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;107:305-315. DOI 10.1007/s11240-011-9981-z.
- Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.V., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;110:69-76. DOI 10.1007/s11240-012-0131-z.
- Zhang W., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2008;117:69-72. DOI 10.1016/j.scienta.2008.03.023.

ORCID ID

E.V. Kozar orcid.org/0000-0001-5447-5341
E.A. Domblides orcid.org/0000-0002-2695-190X
A.V. Soldatenko orcid.org/0000-0002-9492-6845

Благодарности. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90034. Авторы выражают благодарность М. Скапцову за помощь в оценке растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.06.2019. После доработки 02.10.2019. Принята к публикации 02.10.2019.