

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ДИПЛОИДИЗАЦИИ ЭМБРИОИДОВ F1 ГИБРИДА ДЖАЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

Вишнякова Анастасия Васильевна, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, a.vishnyakova@rgau-msha.ru

Александрова Анастасия Алексеевна, магистрант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, a.alexandrova@rgau-msha.ru

Аннотация: В статье изложены результаты исследования по оценке частоты спонтанной диплоидизации растений-регенерантов ярового рапса, полученных в культуре изолированных микроспор. Изучено влияние обработки растений-регенерантов колхицином и амипрофосметилом на частоту диплоидизации.

Ключевые слова: рапс, колхицин, амипрофосметил, частота диплоидизации, культура изолированных микроспор.

Методика получения гаплоидных растений в культуре изолированных микроспор была разработана довольно давно [5] и в настоящее время является достаточно рутинным методом. Удвоения хромосомного набора гаплоидных растений рапса часто становится «тонким местом» в технологии, которое снижает выход удвоенных гаплоидов. Иногда удвоение хромосом у гаплоидов происходит спонтанно, но не всегда и с низкой частотой [4]. Исследования показывают, что 70-90% растений-регенерантов рапса, полученных в культуре микроспор гаплоиды [2].

Известны химические вещества, обработка которыми провоцирует удвоение хромосомного набора. Самым распространенным из них является колхицин. Это природный алкалоид, который выделяют из растений рода *Colchicum*. Для человека это вещество является очень токсичным, что опасно для исследователей, которые с ним работают. Однако многие исследования показывают, что колхицин очень эффективное вещество среди других антимиотиков [3]. К другим веществам, которые имеют схожий эффект и механизмы действия с колхицином, относятся амипрофосметил (АМП), пронамид, профам, оризалин и трифуралин [1].

Целью данной работы было подобрать оптимальные условия для диплоидизации растений-регенерантов ярового рапса.

Материалы и методы

Эмбриониды F1 Джаз, полученные методом изолированных микроспор, культивировали на среде для регенерации В5 с добавлением 25 г/л сахарозы, 11 г/л агара и рН 5,8 до получения растений-регенерантов.

Для удвоения хромосомного набора перед пересадкой в грунт растения-регенеранты обрабатывали колхицином и амипрофосметилом в следующих концентрациях и экспозиции: колхицин 0,1 г/л 3 дня; амипрофосметил 0,1 г/л 2 или 3 дня; амипрофосметил 0,5 г/л 2 дня. Растений-регенеранты помещали в жидкую питательную среду с антимитотическими агентами, которой смачивали вермикулит, или агаризованную питательную среду с добавлением колхицина или амипрофосметила. Культивировали растения с закрытыми крышками при 100% влажности. В случае с колхицином культивацию проводили в темноте.

В качестве контрольного варианта опыта оценивали растения-регенеранты, без обработки антимитотическими агентами.

Оценку плоидности проводили на проточном цитометре Sysmex CyFlow Cube 8. В качестве красителя использовали DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол).

Результаты. В опыте по удвоению числа хромосомного набора ярового рапса сравнивали эффективность двух антимитотических агентов: колхицина и амипрофосметила (АМП).

Оценку плоидности проводили с помощью проточного цитометра. При настройке проточного цитометра, было установлено, что пик графика для гаплоидных растений расположен на 100 у.е. по оси X, а для диплоидных растений на 200 у.е. (рис.)

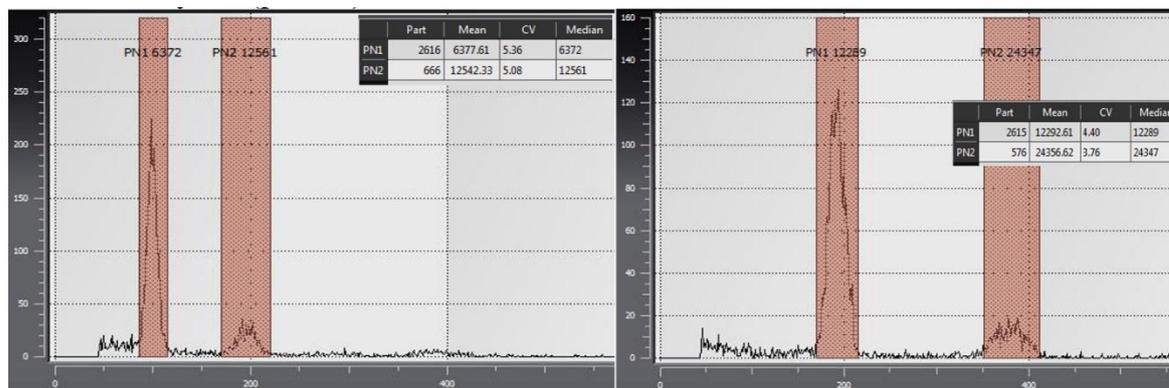


Рис. Оценка уровня плоидности на проточном цитометре (левый график характерен для гаплоидного растения, правый для диплоидного растения)

Результаты по удвоению числа хромосом растений-регенерантов, были пересчитаны в процентном отношении к общему числу оцененных растений (табл.3).

Таблица 1

Результаты определения плоидности растений после обработки колхицином и амипрофосметилом

Вариант обработки	Гаплоид, %	Диплоид, %
Без обработки (контроль)	77	23
Колхицин 3-е суток (концентрация 0.1 г/л)	81	19
АМП 3-е суток (концентрация 0.1 г/л)	25	75

В контрольном варианте опыта, без использования антимиотических веществ, процент диплоидных растений составил 23%. В варианте опыта с обработкой колхицином с концентрацией 0,1 г/л 3-е суток частота удвоения хромосомного набора составила 19%, что меньше контрольного варианта опыта на 4%. В варианте опыта с обработкой амипрофосметилом 3-е суток с концентрацией 0,1 г/л количество растений с удвоенным хромосомным набором составило 75%, что на 52 % больше, чем в контрольном варианте.

Было изучено влияние различных концентраций и количество дней обработки амипрофосметилом на диплоидизацию растений-регенерантов.

Таблица 2

Влияние различной концентрации амипрофосметила и экспозиции на диплоидизацию растений-регенерантов ярового рапса

Вариант обработки	Гаплоид, %	Диплоид, %	Тетраплоид, %
АМП 2-е суток (концентрация 0,5 г/л)	36	55	9
АМП 2-е суток (концентрация 0.1 г/л)	75	25	0
АМП 3-е суток (концентрация 0.1 г/л)	25	75	0

В варианте опыта с обработкой амипрофосметилом 2-е суток с концентрацией 0,5 г/л количество растений с удвоенным хромосомным набором составило 55%. Так же в этом варианте опыта было зафиксировано 9 % тетраплоидов. В варианте опыта с обработкой амипрофосметилом в вермикулите 2-е суток с концентрацией 0,1 г/л количество растений с удвоенным хромосомным набором составило 25%, а при обработке АПМ 3-е суток с концентрацией 0.1 г/л выход диплоидных растений составил 75 %, что выше, чем во всех остальных вариантах опыта.

Выводы. Природа химического вещества влияет на частоту удвоения хромосомного набора. После обработки амипрофосметилом, выход удвоенных гаплоидов был на 56 % выше, чем после обработки колхицином.

Оптимальным вариантом для удвоения хромосомного набора растений-регенерантов рапса ярового является обработка растений амипрофосметилом с концентрацией 0,1 г/л 3-е суток, что приводит к удвоению 75% обработанных растений.

Благодарность: Работа выполнена при поддержке фонда грантов президента Российской Федерации, в рамках соглашения № 075-15-2022-745 от 13.05.2022 года заключенного по гранту МК-3440.2022.5.

Библиографический список

1. Bartels PG, Hilton JL (1973) Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. Pestic Biochem Physiol 3:462–472.

2. Chen J.L. and Beversdorf W.D. 1992. Cryopreservation of isolated microspores of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) for in vitro embryo production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 31: 141–149.

3. Isidre H., Salvador N. Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crop (2020). *Plant Cell Reports* (2021) 40:255–270.

4. Germana, A.T. Anther culture for haploid and doubled haploid production /A.T. Germana// *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2011. - 104:283–300

5. Huang, B., S. Bird, R. Kemble, B. Miki & W. Keller, 1991. Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: effect of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27:28-3 1.

УДК 631.527.541

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА МЕЖДУ ОГУРЦОМ (*CUCUMIS SATIVUS* L.) И ДЫНЕЙ (*CUCUMIS MELO* L.)

Миронов Алексей Александрович, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, a.mironov@rgau-msha.ru

Дегтярева Юлия Сергеевна, магистрант ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, iulia_99@mail.ru

Аннотация: Работа посвящена оценке возможности получения межвидового растения между огурцом и дыней, с целью передачи генов устойчивости к основным заболеваниям и других хозяйственно-ценных признаков. Приведен аналитический обзор используемых методов и полученных результатов.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, спасение зародышей, гормоны

Неудачная интрогрессия в геном *Cucumis sativus* генов из других видов рода *Cucumis* связана с различным количеством хромосом у видов. Для повышения вероятности скрещивания были предложены разные методы, как классические, так и современные биотехнологические. Главной целью получения межвидового растения – передача генов устойчивости к наиболее вредоносному заболеванию огурца – пероноспорозу (ложная мучнистая роса, возбудитель – *Peronospora cubensis*). В мире известны образцы дыни, с генетической устойчивостью к данному заболеванию [1].

Цель работы: аналитический обзор методов, используемых для получения межвидовых растений между огурцом и дыней.

Первое «успешное» скрещивание упоминается в литературе в 1954 году [2]. Исследователи из США провели скрещивание огурца с дыней с помощью