

Эмбриониды моркови (*Daucus carota* L.) как удобный объект для тестирования действия различных веществ на примере разработки протокола удвоения генома для производства удвоенных гаплоидов

М.Г. Фомичева

ФГБНУ Федеральный Научный центр овощеводства (ФГБНУ ФНЦО), п. ВНИИССОК, Московская обл., Россия
maria.fomicheva.1@yandex.ru

Цель: Получение удвоенных гаплоидов моркови столовой (*Daucus carota* L.) ускоряет селекцию этой важной овощной культуры на несколько поколений. Однако гаплоидные растения часто не удваивают геном спонтанно, вследствие чего требуется искусственное удвоение хромосомного набора, что осложняется отсутствием эффективных протоколов. Мы изучали токсическое действие и эффективность удвоения ДНК моркови при обработке различными концентрациями антимитотических агентов – колхицина и трифлуралаина – с целью разработки наиболее эффективного метода удвоения генома моркови столовой.

Материалы и методы: Гаплоидные эмбриониды моркови были получены в культуре микроспор. Пloidность была протестирована с помощью проточного цитометра. Для экспериментов по обработке трифлуралаином гаплоидные эмбриониды помещали в стеклянную культуральную посуду со средой и добавляли трифлуралаин в концентрациях 0,001, 0,01, 0,1 и 1 г/л. Для обработки колхицином гаплоидные эмбриониды культивировали в 6-луночных планшетах со средой и колхицином в концентрациях 0,01, 0,1 и 1 г/л. Обработки проводили в темноте для предотвращения деградации антимитотических агентов под воздействием света. После обработки в течение 48 часов эмбриониды промывали стерильной водой и переносили на свежую среду. Через 7–10 дней после обработки эмбриониды переносили в пробирки со средой для регенерации растений. Через 1,5–2 месяца определяли ploидность растений-регенерантов с помощью проточной цитометрии. В качестве внешнего стандарта использовали диплоидное донорное растение моркови, выращенное из семени. Листья растений измельчали в лизирующем буфере Гэлбрейта, затем профильтровывали и окрашивали ядра иодидом пропидия. Далее ядра анализировали на проточном цитометре. Растения разной ploидности доращивались и высаживались для адаптации в торф.

Результаты: Впервые мы протестировали обработку моркови антимитотическими агентами на стадии эмбрионидов. Интенсивный вторичный эмбриогенез эмбрионидов моркови позволил нам получить большое число эмбрионидов одного генотипа – не менее 30 штук на каждую концентрацию антимитотического агента. Малый размер эмбрионидов позволяет проводить обработки в небольших объемах с минимальным количеством реагентов. Мы показали, что 0,01–1 г/л колхицин не нарушает развитие моркови. Трифлуралаин не оказывал токсического действия при концентрациях 0,001–0,01 г/л, но 0,1 г/л трифлуралаин снижал выживаемость в среднем на 40% и замедлял регенерацию проростков. При концентрации 1 г/л трифлуралаина все эмбриониды погибали. С помощью проточной цитометрии мы показали, что 0,01–1 г/л колхицин и 0,001–0,1 г/л трифлуралаин могут удваивать геном моркови. Самый высокий процент диплоидов наблюдался при 1 г/л колхицина (34%) и 0,1 г/л трифлуралаина (28%). Самый высокий процент диплоидов вместе с миксopлоидами (частичными диплоидами) был при обработке 0,01 и 0,1 г/л трифлуралаином (более 70%) и 1 г/л колхицином (56%). При повышении концентрации антимитотических агентов снижалось число гаплоидных растений, и при этом повышалось число растений с большей ploидностью, в том числе количество тетраплоидов и октоплоидов. Насколько нам известно, трифлуралаин тестировался впервые для удвоения генома у растений моркови. Растения с развитой корневой системой переносились в торф, где успешно адаптировались к условиям *ex vitro* в отличие от данных предыдущих исследований, в которых обработке подвергали растения *in vitro*, после чего их сразу переносили для адаптации, в результате чего растения погибали.

Выводы: В нашем исследовании мы выявили наиболее эффективные и наименее токсичные концентрации колхицина и трифлуралаина и разработали протокол обработки эмбрионидов моркови, который можно использовать для производства ДН-линий моркови столовой и дальнейшего улучшения методов удвоения генома.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-76-01034.