

На правах рукописи

КОЗАРЬ
Елена Викторовна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ
РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО (*RAPHANUS SATIVUS* L.) В КУЛЬТУРЕ
ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO***

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Автореферат
Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО)

Научный руководитель:

Домблидес Елена Алексеевна, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»

Официальные оппоненты:

Калашникова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева»

Горлова Людмила Анатольевна, кандидат биологических наук, заведующая отделом селекции рапса и горчицы ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР)»

Защита диссертации состоится 20 декабря 2022 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.258.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» по адресу: 350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3. Тел. (факс): (861) 205-15-55.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр риса», а также на сайте – <http://vniirice.ru>, с авторефератом на сайтах: Высшей аттестационной комиссии – <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» – <http://vniirice.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Л. В. Есаулова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы. В распоряжении правительства РФ «Об утверждении перечня показателей в сфере обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации» овощным культурам отводится третье место. В России доля импортных семян овощных культур составляет около 80%, поэтому на селекцию возложена задача повышения эффективности овощеводства путем создания новых отечественных сортов и гибридов F₁.

Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* (андрогаenez, isolated microspore culture – ИМС) занимает ведущее место в селекционных программах по ускорению создания гибридов F₁, и в крупнейших иностранных селекционных кампаниях (Syngenta, Bayer и др.) для ряда сельскохозяйственных культур получение удвоенных гаплоидов поставлено на конвейерную основу. Тем не менее универсальных ИМС протоколов не существует, и многие овощные культуры остаются неотзывчивыми к андрогаenezу. Редис европейский (РЕ) – одна из таких культур в семействе Brassicaceae. До настоящего времени не было сведений об успешном завершении полного цикла получения удвоенных гаплоидов РЕ и отсутствовали фундаментальные исследования по изучению этапов андрогаenezа в условиях *in vitro*, позволяющие определить основные причины и пути преодоления его низкой отзывчивости. Поэтому изучение андрогаenezа и разработка ИМС технологии для РЕ актуальная тема для исследований.

Цель исследования: разработать технологию получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* для создания исходных гомозиготных линий для селекции сортов и гибридов F₁.

Задачи:

1. Выявить и исследовать влияние критических факторов на индукцию эмбриогенеза и формирование эмбриоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro*, определить оптимальные условия по данным факторам для получения эмбриоидов и изучить особенности андрогаenezа РЕ.
2. Изучить влияние состава питательных сред на эффективность регенерации эмбриоидов РЕ и определить оптимальный их состав для индукции побегообразования.
3. Изучить особенности этапа корнеобразования у микропобегов РЕ и оптимизировать этот этап для повышения эффективности ИМС протокола.
4. Получить растения-регенеранты РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* и провести анализ их плоидности.
5. Провести инбридинг растений-регенерантов РЕ для получения ДН-линий – исходного материала для селекции.

Научная новизна.

В процессе выполнения диссертационной работы впервые изучены все этапы андрогенеза РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* и обнаружены новые паттерны формирования эмбриогенных структур, ранее не описанные в литературе ни для одной из культур – упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента. Для РЕ впервые исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной среды, режим термообработки), проведены наблюдения за поведением этой культуры на всех этапах ИМС технологии и обнаружены биологические особенности на этапе укоренения. Впервые подобраны оптимальные условия для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и дальнейшего органо-генеза растений-регенерантов РЕ. Применен нестандартный подход к подбору питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренения микропобегов РЕ. Для семейства Brassicaceae впервые была показана эффективность применения питательной среды МС с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина на этапе индукции эмбриогенеза и жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе укоренения микропобегов РЕ. Найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологии РЕ на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза. Выявлена высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов РЕ. В результате работы разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для РЕ и впервые получены ДН-линии этой культуры.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные новые сведения о паттернах формирования эмбриогенных структур при андрогенезе РЕ расширяют теоретические знания о биологии эмбриогенеза в целом. Предложенный оригинальный способ изоляции микроспор позволяет повысить эффективность ИМС технологии, как для РЕ, так и для других культур семейства Brassicaceae (Kozar et al., 2022). Разработанный принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывает перспективы для разработки новых способов индукции ризогенеза различных культур, как в рамках ДН-технологий, так и в других технологиях, где необходим этап укоренения растений *in vitro* (микрореклональное размножение растений, агробактериальная трансформация растений и др.) Применение в селекционных программах разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in*

in vitro позволяет ускорить создание исходного гомозиготного материала для гибридов F₁ в два-четыре раза по сравнению с традиционными методами селекции. Полученные ДН-линии РЕ являются ценным материалом для селекции и могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

Материал, методология и методы исследования.

Исследования проводились с использованием стандартных методик с различными модификациями и последующей статистической обработкой данных, согласно главе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эмбриогенез РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* имеет ряд особенностей биологического развития, ранее не отмеченных для других культур семейства Brassicaceae.

2. Разработка новых методических подходов и подбор критических факторов на разных этапах эмбриогенеза, регенерации эксплантов, ризогенеза *in vitro* и укоренения *in vivo*, повышает эффективность технологии и позволяет завершить полный цикл получения ДН-растений РЕ.

3. Редису европейскому в культуре изолированных микроспор *in vitro* свойственна высокая частота спонтанного удвоения хромосом, и обработка антимиотическими веществами не требуется.

4. Разработанный ИМС протокол позволяет создать гомозиготные линии РЕ для селекции сортов и гибридов F₁ в два-четыре раза быстрее, чем традиционными методами селекции.

Апробация результатов работы.

Результаты исследований диссертационной работы были представлены на: 1) VIII Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем» (2018 г., Россия, г. Звенигород); 2) Научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (2018 г., Россия, г. Москва, ВНИИСБ, РАН); 3) 2-м Средиземноморском форуме для аспирантов и молодых исследователей «Research and Innovation as Tools for Sustainable Agriculture, Food and Nutrition Security» (2018 г., Италия, г. Бари); 4) Международной конференции «Состояние и перспективы селекционных исследований культур семейства Brassicaceae в современных условиях» (2019 г., Россия, г. Санкт-Петербург, ВИР); 5) 3-й Международной конференции «Plant Cells & Tissue in Vitro III» (2019 г., Австрия, г. Вена); 6) 7-й Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции, семеноводстве и товарном производстве овощных, бахчевых и цветочных культур. Традиции, современность, перспективы» (2020 г., Россия, Московская обл., ФГБНУ ФНЦО); 7) 12-й Международной школе молодых ученых «Системная биология и

биоинформатика» SBV-2020 (2020 г., Россия, Республика Крым); 8) Международной конференции «Биотехнология, наука и практика» (2020 г., Россия, Республика Крым); 9) 21-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (2021 г., Россия, г. Москва, ФГБНУ ВНИИСБ); 10) Всероссийской конференции «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (2022 г., Россия, г. Санкт-Петербург, ВИР).

Личный вклад автора. Экспериментальные исследования, обработка и анализ данных, а также постановка проблемы, целей и задач исследований на 85% выполнены автором.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них: 2 работы в журналах, входящих в перечень ВАК РФ; 4 работы в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science; 6 работ в сборниках докладов и тезисов; в том числе поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН-линиям РЕ: Жегалов (заявка от 13.07.22 г. № 86648/7754534), Веня (заявка от 13.07.22 г. № 86649/7754535), Персей (заявка от 13.07.22 г. № 86647/7754533) и заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae» (заявка от 25.05.2022 г. № 2022114090/10(029482)).

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 128 страницах компьютерного текста; содержит: 7 таблиц, 34 рисунка и 7 приложений; состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, рекомендаций по практическому применению результатов диссертационной работы, списка использованной литературы и приложений. Список литературы содержит 167 источников, из них – 154 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены сведения о народнохозяйственном значении РЕ, систематике рода *Raphanus*, современном состоянии селекции РЕ в России и мире, о гаплоидных технологиях в селекции, о культуре изолированных микроспор в семействе Brassicaceae и отдельно для вида *R. sativus* L., об эмбриогенезе в культуре изолированных микроспор *in vitro* семейства Brassicaceae, о факторах, влияющих на получение удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro*: стадия развития микроспор, чистота препарата, температурный стресс, питательная среда (ПС) для индукции эмбриогенеза, регуляторы роста, ПС для регенерации и ПС для укоренения.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал исследования: всего в опытах протестировано 42 генотипа РЕ отечественной и зарубежной селекции. Во всех исследованиях по разработке технологии использовали отзывчивые к ИМС технологии сортообразцы редиса европейского: Тепличный Грибовский (ТГ), Моховский (Мох), Розово-красный с белым кончиком (РБК) и Родос, если не указано иное.

Выращивание растений-доноров, введение микроспор в культуру и все этапы регенерации проводили согласно протоколу, описанному в методических рекомендациях Домблидес Е. А. и др., 2016, с последующим изменением элементов технологии согласно описанным ниже опытам.

Для определения качественного состава популяции микроспор и оценки его влияния на выход эмбриоидов использовали метод дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) и бутоны размером от 2,5 мм до 6,0 мм (выход эмбриоидов оценивали на сортообразце РЕ ТГ).

Для оценки загрязненности препарата микроспор и качественного состава их популяции в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор и для оценки выхода эмбриоидов в зависимости от способа изоляции использовали сортообразец РБК; бутоны размером от 2,5 до 4,5 мм; способы изоляции: 1) Растирание бутонов пестиком в ПС в ступке; 2) Разбивка бутонов в бьюксах с ПС на магнитной мешалке; 3) Поперечное разрезание бутонов скальпелем с взбалтыванием половинок бутонов в пробирках с ПС на вортексе (для оценки выхода эмбриоидов изоляцию № 1 не применяли).

Для оценки влияния состава ПС на индукцию эмбриогенеза использовали среды: NLN-13 (Lichter, 1982); ½-нормы NLN-13 и МС (Murashige, Skoog, 1962) с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина (Vjurtts et al., 2017).

Для оценки влияния длительности температурной обработки на выход эмбриоидов обработку проводили сразу после введения микроспор в культуру при температуре 32°C с экспозициями 1–4 суток.

При подборе ПС для индукции побегообразования использовали эмбриоиды РЕ, полученные из сортообразцов РБК, ТГ, Мох и Родос; тестировали среду МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара с вариантами: 1) Без гормонов; 2) С 0,1 мг/л БАП; 3) С 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК; 4) С 0,2 мг/л тиадизурона (ТДЗ).

Для оценки эффективности ризогенеза РЕ при использовании стандартного ИМС протокола для семейства Brassicaceae использовали все ДН-линии РЕ, полученные с помощью ИМС технологии, в том числе из сортообразцов РБК – ДН-линии № 1, № 2, ТГ – № 3 и Родос – № 4; применяли безгормональную среду МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара.

Для оценки влияния состава ПС на ризогенез РЕ использовали ДН-линии РЕ; применяли среды: МС с 2% сахарозы, 7 г/л агара без гормонов и с добавлением ИУК или ИМК в концентрациях 0,5; 1,0 или 2,0 мг/л.

Для оценки влияния способов посадки микрополюгов (МП) на ризогенез использовали ДН-линии РЕ, которые были получены из сортообразцов РБК – № 1, № 2 и ТГ – № 3; применяли способы посадки: 1) С погружением базальной части МП на 2–3 мм в ПС; 2) В лунку, сделанную в ПС с помощью стерильного пинцета; 3) МП на поверхность ПС без заглубления.

При изучении влияния пересадок МП с иссечением корнеплодоподобных структур (КС) в области гипокотилия на ризогенез МП РЕ применяли твердую безгормональную ПС МС; осуществляли от одной до шести последовательных пересадок; использовали ДН-линии РЕ, полученные из сортообразцов РБК – № 1, № 2 и ТГ – № 3.

Изучение эффективности ризогенеза микрополюгов РЕ на жидкой ПС с последовательными пересадками с иссечением КС проводили на ПС МСм (Masuda et al., 1981) с 0,1 мг/л кинетина и 2% сахарозой; использовали ДН-линии РЕ, полученные из сортообразцов РБК – № 1, № 2, ТГ – № 3 и Родос – №4.

Определение плоидности растений-регенерантов проводили методами: проточной цитометрии клеточных ядер, подсчета числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски, подсчета числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых статистических методов в программах Microsoft Excel и Statistika 6.0.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Культура изолированных микроспор *in vitro* РЕ

Оценка качественного состава популяции микроспор в бутонах различного размера представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Зависимость между длиной бутонов разных генотипов РЕ и содержанием в них микроспор на восприимчивых к эмбриогенезу стадиях развития

Генотип (сорто-образец)	Доля микроспор на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития в бутонах разной длины, %						
	2,5–3,0 мм	3,0–3,5 мм	3,5–4,0 мм	4,0–4,5 мм	4,5–5,0 мм	5,0–5,5 мм	5,5–6,0 мм
Родос	38.2±5.6ab	43.7±4.8a	25.1±3.2b	17.3±2.1c	15.8±3.4c	12.6±4.2d	10.4±5.1d
ТГ	29.8±2.3c	38.2±5.1b	46.8±4.0a	40.5±2.7b	27.2±3.5c	21.4±6.2cd	18.5±3.9d
Мох	28.1±4.2b	51.2±2.4a	30.3±3.7b	25.2±3.0b	19.9±2.7c	18.7±1.9c	18.9±3.2c
РБК	29.1±3.3b	44.2±2.9a	43.7±3.1a	28.6±4.6b	20.1±3.8cd	17.6±4.1d	16.8±3.7d
Среднее	31.3	44.3	36.5	27.9	20.75	17.6	16.2

В таблице приведены средние ± Sd. Варианты, отмеченные одной и той же буквой (сравнение доли микроспор на восприимчивых к эмбриогенезу стадиях развития в зависимости от диапазона размеров бутонов в пределах одного генотипа), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT).

Установлено, что структура популяции микроспор в пыльниках бутонов РЕ неоднородна, и процент восприимчивых микроспор в бутонах РЕ редко достигает 50%, что может являться главной причиной низкой отзывчивости РЕ к ИМС технологии (в бутонах отзывчивых культур семейства Brassicaceae доля отзывчивых микроспор достигает 80%).

Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбриоидов представлено на примере сортообразца Тепличный Грибовский (Рисунок 1).

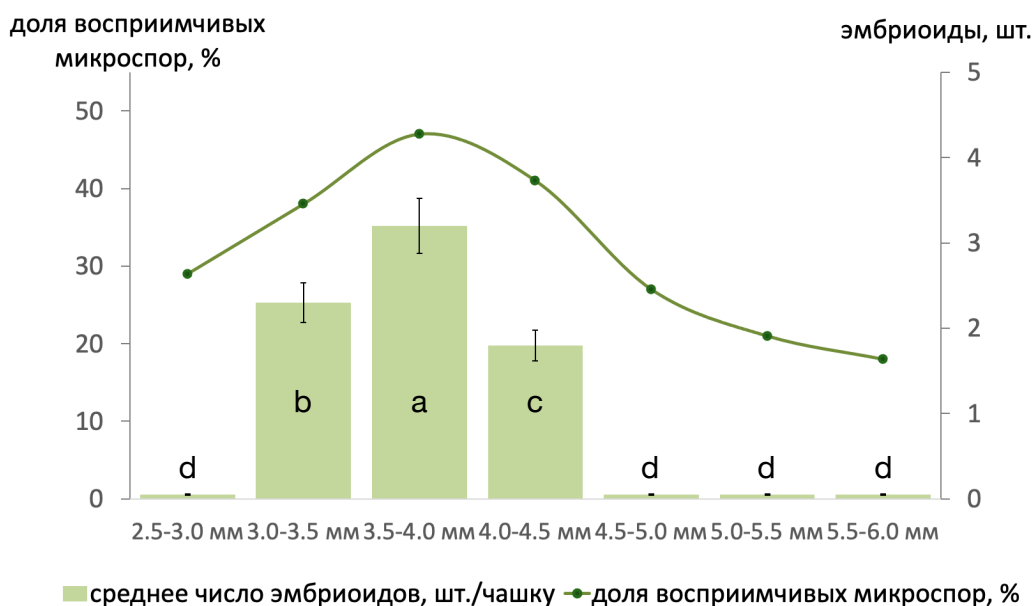


Рисунок 1 – Зависимость выхода эмбриоидов от размера бутона и процентного содержания микроспор на восприимчивой стадии развития сортообразца РЕ Тепличный Грибовский. Столбчатая диаграмма построена по средним вариантам опытов с варьированием по повторностям. Столбцы диаграммы с одинаковой буквой (сравнение выхода эмбриоидов в зависимости от диапазона размеров бутонов) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT).

В результате опыта было подтверждено, что выход эмбриоидов определяется долей отзывчивых микроспор в ИМС культуре, при снижении их доли в бутонах ниже 30% эмбриоиды не образуются.

Оценка загрязненности препарата и качественного состава популяции микроспор в препарате в зависимости от способов изоляции микроспор. В препаратах микроспор РЕ помимо микроспор присутствуют различные включения (мусор), которые могут оказывать токсическое действие на ИМС культуру. В таблице 2 представлены результаты сравнения чистоты препарата при новом (№ 3) и стандартных (№ 1, № 2) способах изоляции микроспор.

Было показано, что при растирании пестиком (способ № 1) препарат был наиболее загрязнённым, при использовании магнитной мешалки (способ № 2) препарат показал промежуточные значения степени загрязнения, при разрезании (способ № 3) препарат был наиболее чистым (коэффициент загрязнения в 52 и 15 раз ниже, чем при использовании способов № 1 и № 2 соответственно).

Таблица 2 – Загрязнение мусором препаратов культуры микроспор редиса европейского РБК в зависимости от способа изоляции микроспор и линейного размера бутонов на первый день культивирования

Размер бутона, мм	Коэффициент соотношения в препарате мусора, шт. к микроспорам, шт.			Среднее	Двухфакторный дисперсионный анализ: Факторы/ Значение сумм квадратов (SS) / Доля влияния фактора, %
	Способ изоляции №1	Способ изоляции №2	Способ изоляции №3		
2.0-2.5	13.60 b/A	11.45 a/A	0.59 a/B	8.55	размер бутона ***/576.8/ 9% способ изоляции***/ 4279.0/ 64% размер бутона x способ изоляции ***/ 1673.8/ 25% случайные факторы/ 120.7/ 2%
2.5-3.0	16.31 b/A	3.95 c/B	0.28 a/C	6.85	
3.0-3.5	40.47 a/A	6.40 bc/B	0.38 a/C	15.75	
3.5-4.0	35.33 a/A	3.72 c/B	0.46 a/B	13.17	
4.0-4.5	12.06 b/A	8.30 ab/B	0.52 a/C	6.96	
Среднее	23.55	6.76	0.45		

Значения в таблице являются средними; *, ** и ***: отличия значимы на 5%, 1% и 0,5% уровнях вероятности, соответственно, нз: не значимы. Значения с одинаковой маленькой буквой в столбцах (сравнение коэффициента загрязнения препарата во всех диапазонах размеров бутонов в рамках одного способа изоляции) и заглавной буквой в строках (сравнение коэффициента загрязнения препарата при разных способах изоляции в рамках одного диапазона размеров бутонов) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

Оценка популяционного состава микроспор в зависимости от способа изоляции микроспор и размера бутонов представлена на рисунке 2.

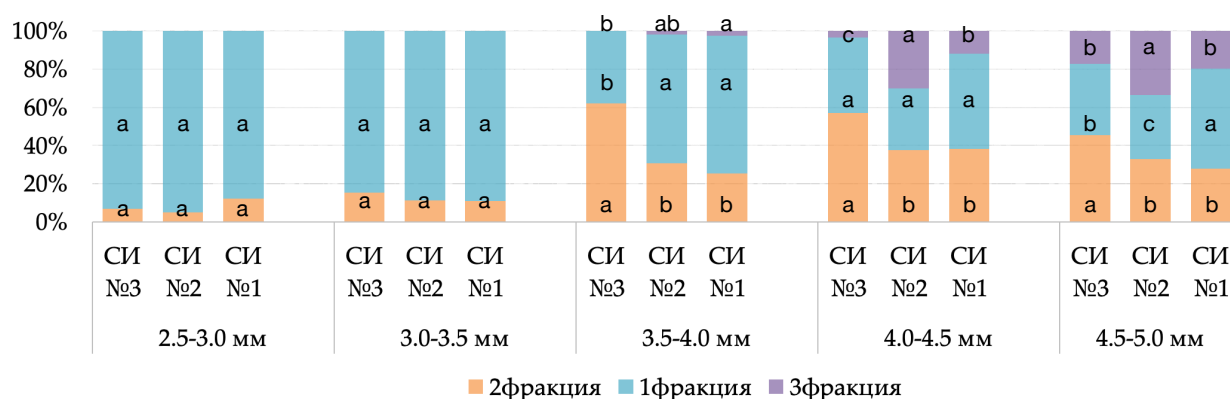


Рисунок 2 – Соотношение различных фракций в популяции микроспор РЕ РБК в зависимости от размера бутонов и способа изоляции

1 фракция – очень ранние стадии развития микроспор; 2 фракция – оптимальные для индукции эмбриогенеза стадии развития микроспор; 3 фракция – поздние стадии развития микроспор. СИ – способ изоляции. Участки диаграммы с одинаковой буквой (сравнение величины доли фракции микроспор при различных способах изоляции в рамках одной фракции микроспор (один цвет) и одного диапазона размеров бутонов) существенно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT).

Относительная концентрация микроспор второй фракции (поздняя одноядерная вакуолизированная и ранняя двухъядерная стадии развития) при третьем способе изоляции на диапазоне размеров бутонов 3,5–5,0 мм была значимо выше, чем при способах изоляции № 1 и № 2.

Оценка выхода эмбриоидов в зависимости от способов изоляции микроспор представлена в таблице 3 на примере сортообразца РЕ РБК. Урожайность эмбриоидов на чашку Петри увеличилась примерно в 3 раза при способе изоляции № 3 по сравнению со способом изоляции № 2. То есть было показано, что

эффективность ИМС технологии можно повысить за счет модификации способа изоляции микроспор.

Таблица 3 – Урожайность эмбриоидов РЕ РБК на 30-й день культуры в зависимости от способа изоляции и линейного размера бутона

Размер бутона, мм	Способ изоляции №2	Способ изоляции №3	Среднее	Двухфакторный дисперсионный анализ: Факторы/ Значение сумм квадратов (SS) / Доля влияния фактора, %
3.0-3.5	0.3 а/В	7.0 а/А	3.65	размер бутона ^{нз} / 23.1/ 17% способ изоляции ^{**} / 32.0/ 23% размер бутона x способ изоляции ^{**} / 36.0/ 26% случайные факторы/ 47.3/ 34%
3.5-4.0	2.7 а/А	3.3 ab/А	3.00	
4.0-4.5	0.7 а/А	1.3 b/А	1.00	
Среднее	1.23	3.87		

Значения в таблице являются средними; *, ** и ***: отличия значимы на 5%, 1% и 0,5% уровнях вероятности, соответственно, ns: не значимы. Значения с одинаковой маленькой буквой в столбцах (сравнение выхода эмбриоидов при различных диапазонах размеров бутонов в рамках одного способа изоляции) и заглавной буквой в строках (сравнение выхода эмбриоидов при различных способах изоляции в рамках одного диапазона размеров бутонов) достоверно не различаются с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

Влияние состава питательной среды на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор *in vitro* РЕ. Был применен нестандартный подход к подбору питательных сред, где во внимание принималось не только видовое сходство растений (семейство Brassicaceae), но и сходство по типу формирования продуктового органа (корнеплод), ввиду чего, помимо стандартных сред для семейства Brassicaceae – NLN-13 и ½-нормы NLN-13, была протестирована среда МС с 500 мг/л гидролизата казеина (МС-13), которая применяется для моркови столовой. При инкубировании микроспор РЕ на средах NLN-13 и МС-13 эмбриоиды были получены у четырех сортообразцов (Таблица 4) (при использовании питательной среды ½-нормы NLN-13 индукция эмбриогенеза отсутствовала).

Таблица 4 – Влияние состава питательных сред на эмбриогенез (выход эмбриоидов, шт./1 чашка Петри ± Sd) в ИМС культуре у разных генотипов РЕ

Генотип (сорто-образец)	NLN-13		МС-13		Двухфакторный дисперсионный анализ: Факторы/ Значение сумм квадратов (SS) / Доля влияния фактора, %
	Среднее	Максимальное	Среднее	Максимальное	
Родос	0 b	0	3.8±0.6 a	6	генотип ^{***} / 24.1/ 13% питательная среда ^{нз} / 0.4/ 0.2% генотип x питательная среда ^{***} / 97.8/ 53% случайные факторы/ 61.2/ 33%
ТГ	2.4±0.5 b	4	4.6±1.0 a	8	
Мох	1.8±0.4 a	3	1.0±0.3 a	2	
РБК	4.4±1.0 a	8	0 b	0	
Среднее	2.15		2.35		

*, ** и ***: отличия значимы на 5%, 1% и 0,5% уровнях вероятности, соответственно, нз: не значимы. Варианты, отмеченные одной и той же буквой (сравнение выхода эмбриоидов в зависимости от среды для индукции эмбриогенеза в рамках одного генотипа), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

Показано, что доля влияния взаимодействия факторов генотип x состав питательной среды составила более 50%, что свидетельствует о высокой

генотипспецифичности культуры РЕ к составу питательной среды для индукции. Так, у сортообразца Родос эмбриониды были получены только на среде МС-13 (до шести эмбрионидов на чашку Петри), для сортообразца Тепличный Грибовский эта среда также оказалась более подходящей (до восьми эмбрионидов на чашку Петри). Для сортообразцов Моховский и РБК лучшие результаты были получены на стандартной среде NLN-13, и максимальный выход достиг трех и восьми эмбрионидов на чашку Петри соответственно. Это свидетельствует о необходимости тестирования обеих сред для индукции при введении новых сортообразцов РЕ в ИМС культуру.

Влияние длительности температурной обработки 32°C сразу после введения микроспор в культуру на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор РЕ оценивали в течение одних-четырех суток. Было показано, что для сортообразцов Родос, Моховский и РБК оптимальна обработка в течение двух суток, и только для сортообразца Тепличный Грибовский – одни сутки. Инкубация микроспор в течение трех суток приводила к замедлению скорости развития эмбрионидов у сортообразца РБК и полному их отсутствию у остальных сортообразцов. При увеличении времени температурной обработки до четырех суток эмбриониды не образовывались.

Эмбриогенез РЕ в ИМС культуре. В результате исследования были изучены все стадии и паттерны развития эмбрионидов РЕ с первого дня культивирования микроспор. Структуры, возникающие при культивировании микроспор *in vitro* разнообразны, и можно наблюдать совершенно различную морфологию делений в зависимости от степени и времени высвобождения микроспор из экзины, которая считается одним из основных регуляторов начальных путей развития эмбриоида (Tang et al., 2013; Shmykova et al., 2021).

На второй день культивирования микроспор РЕ мы наблюдали различные варианты разрывов экзины – от интактных до полностью свободных от экзины микроспор, что ранее не было описано в литературе. Tang et al. (2013), исследуя эмбриогенез рапса, предположили, что разрыв экзины в большинстве случаев определяет ось первого деления микроспоры, что происходит из-за разницы давления внутри клетки между ее областями с экзиной и без нее. Однако в культуре РЕ часто встречались первые деления микроспор, которые были перпендикулярны оси разрыва экзины, что ставит под сомнение ведущую роль разрыва экзины в определении оси первого деления микроспоры.

В том числе Tang et al. (2013) тщательно изучили путь развития микроспор с одним разрывом экзины. Они показали, что полярность эмбрионидов зависит от разрыва экзины и не связана с ассиметричным делением клеток, поскольку разрыв экзины еще до первого деления клеток вызывает реорганизацию органелл, которая фиксирует дальнейшую апикально-базальную ось эмбрионидов. В наших

исследованиях это было подтверждено для одиночных эмбриоидов – в эмбриогенных структурах будущих одиночных эмбриоидов, сформированных из микропор с одним разрывом экзины, длинная ось деления (полярность/будущая апикально-базальная ось) всегда была перпендикулярна оси разрыва экзины. Однако, мы полагаем, что пути формирования близнецовых эмбриоидов, прикрепленных друг к другу без суспензора, не столь однозначны, как описывали Tang et al. (2013), поскольку мы наблюдали различные типы прикрепления близнецов, в том числе через апикальную часть одного и базальную часть другого эмбриоида.

В нашем исследовании было показано, что сам эмбриоид может развиваться как из покрытой экзиной клетки, так и из клетки без экзины, что согласуется с данными Tang et al. (2013) и не согласуется с данными других авторов (Supena et al., 2008; Li et al., 2014).

В литературе описано, что вакуолизированные клетки развиваются в суспензор, а более "плотные" клетки – в эмбриоиды (Soriano et al., 2014). В наших исследованиях мы наблюдали аналогичные сценарии развития клеток в зависимости от степени их вакуолизации.

В отличие от многих исследований, описывающих классический эмбриогенез с интактной экзиной, где деления клеток до ее разрыва происходят бессистемно и апикально-базальная ось формируется после ее разрыва (Hause et al., 1994; Tang et al., 2013; Soriano et al., 2014), в наших наблюдениях некоторые микроспоры демонстрировали упорядоченные деления уже в интактных экзинах.

Деления микроспор PE с обширным разрывом экзины и те, которые полностью вышли из нее, образовывали несколько слабо связанных клеток (рыхлый каллус). Ранее считалось, что каллусоподобные структуры не являются эмбриогенными (Hause et al., 1994; Ilić-Grubor et al., 1998), но затем было показано, что они экспрессируют несколько генов эмбриональной идентичности и способны формировать эмбриоиды (Li et al., 2014; Corral-Martínez et al., 2020). Мы можем подтвердить, что микроспоры с обширным разрывом экзины являются эмбриогенными – большинство эмбриогенных структур PE с суспензорными клетками не имели следов прикрепленных остатков экзины (мы считаем, что клеточные деления микроспор с обширным разрывом экзины сходны по своей морфологии с делениями микроспор, полностью свободных от экзины, т. к. в обоих случаях экзина не оказывает давления на протопласт микроспоры).

В культуре микроспор *in vitro* PE мы наблюдали два пути развития эмбриоидов с суспензором. В одном случае формирование суспензора и эмбриоида происходило одновременно, а во втором – клетки сначала делились поперечно и формировали суспензор и только затем формировали эмбриоид, что согласуется с данными других исследователей (Supena et al., 2008; Prem et al., 2012; Tang et al., 2013). В литературе существуют различные мнения относительно механизма

формирования эмбриоида с суспензором (Corral-Martínez et al., 2020). Supena et al. (2008) отметили, что, хотя они наблюдали различные варианты формирования суспензоров, они никогда не прикреплялись к апикальной части эмбриоидов. Из этих наблюдений они сделали вывод о функции суспензора в определении будущей апикально-базальной оси эмбриоидов. В нашем исследовании мы наблюдали различные места прикрепления суспензора относительно апикально-базальной оси эмбриоидов, в том числе между семядолями и сбоку от апикальной части (Рисунок 3). Эти наблюдения позволяют опровергнуть вывод о том, что суспензор определяет апикально-базальную ось эмбриоидов и всегда является маркером будущей базальной части.

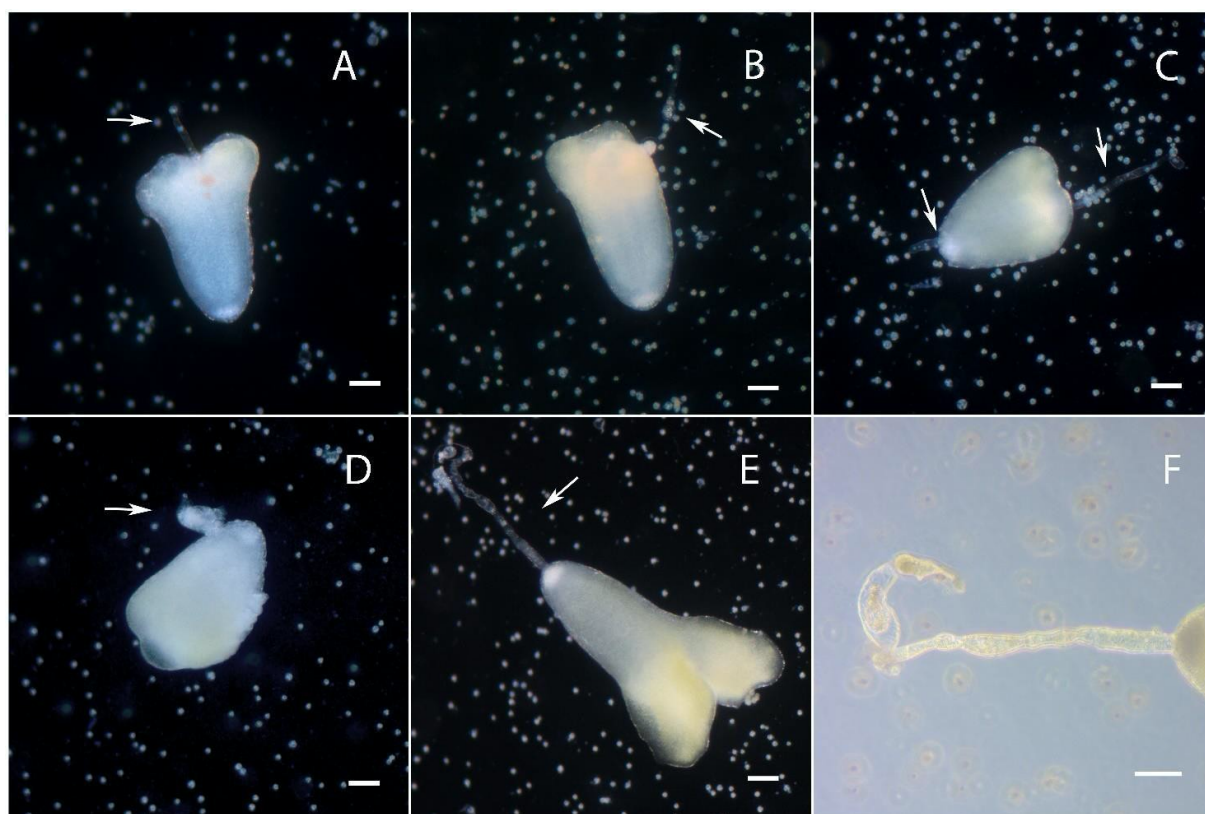


Рисунок 3 – Эмбриоиды РЕ, полученные в ИМС культуре, с различными типами прикрепления суспензоров:

Белые стрелки указывают на суспензоры. (А) Эмбриоид с прикреплением суспензора к апикальной части между семядолей; (В) эмбриоид с прикреплением суспензора к апикальной части с боковой стороны; (С) эмбриоид, сформированный в центральной части суспензора с апикально-базальной осью эмбриоида, параллельной оси суспензора, так что одна часть суспензора прикреплена к базальной части эмбриоида, а другая к апикальной части; (D) эмбриоид с суспензором, прикрепленным к базальной части латерально; (Е) эмбриоид с суспензором, прикрепленным к центральной оси базальной части эмбриоида; (F) суспензор с нерегулярными клеточными перегородками и различной длиной клеток. Размер линейки = 100 мкм.

В ряде исследований отмечается, что эмбриоиды с суспензорами развиваются медленнее, чем эмбриоиды без них, в нашем эксперименте такой закономерности не прослеживалось.

В сравнении с эмбриоидами рапса, эмбриоиды РЕ до семядольной стадии развития созревают быстрее (26–40 дней – рапс и 18–23 дня – РЕ; Рисунок 4),

однако до глобулярной стадии развития эмбриогенез протекает с одинаковой скоростью (Prem et al., 2012)

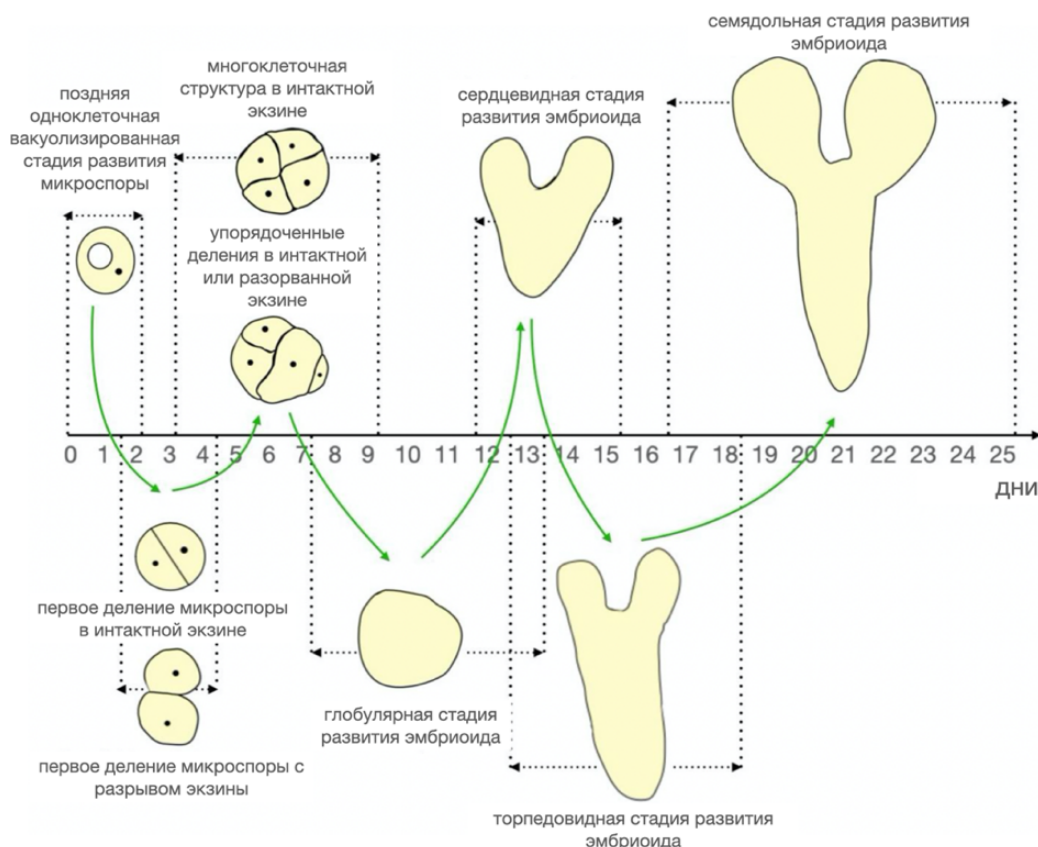


Рисунок 4 – Стадии развития эмбриоида РЕ в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от дня культивирования

Таким образом, эмбриогенез микроспор РЕ в культуре микроспор *in vitro* во многом схож с эмбриогенезом других культур Brassicaceae, но есть особенности, которые ранее не были описаны в литературе и требуют особого внимания при дальнейших исследованиях.

3.2 Индукция побегообразования РЕ

Оценка влияния состава ПС для регенерации на эффективность побегообразования РЕ показала, что прямого прорастания эмбриоидов не происходило. Частота образования точек роста с последующим побегообразованием составила от 30 до 80% (для всех ПС, кроме варианта с ТДЗ) в зависимости от генотипа и состава ПС. У большинства сортообразцов лучшие результаты были получены на ПС с совместным добавлением БАП и ГК (от 69 до 80%). Исключение составил сортообразец ТГ, где лучший результат (63%) был получен на ПС с добавлением БАП. Включение в состав ПС ТДЗ дало отрицательный эффект – все эмбриоиды темнели и погибали в течение трех-пяти суток.

3.3 Укоренение микропобегов редиса европейского

Укоренение микропобегов РЕ при использовании стандартного протокола ИМС технологии для семейства Brassicaceae. При использовании стандартной технологии укоренения ДН-растения РЕ в зависимости от генотипа

формировали нормальную корневую систему максимум в 6% случаев (Рисунок 5, тип I). В остальных случаях базальная часть микропобегов разрасталась, образуя корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухольями (ВО).

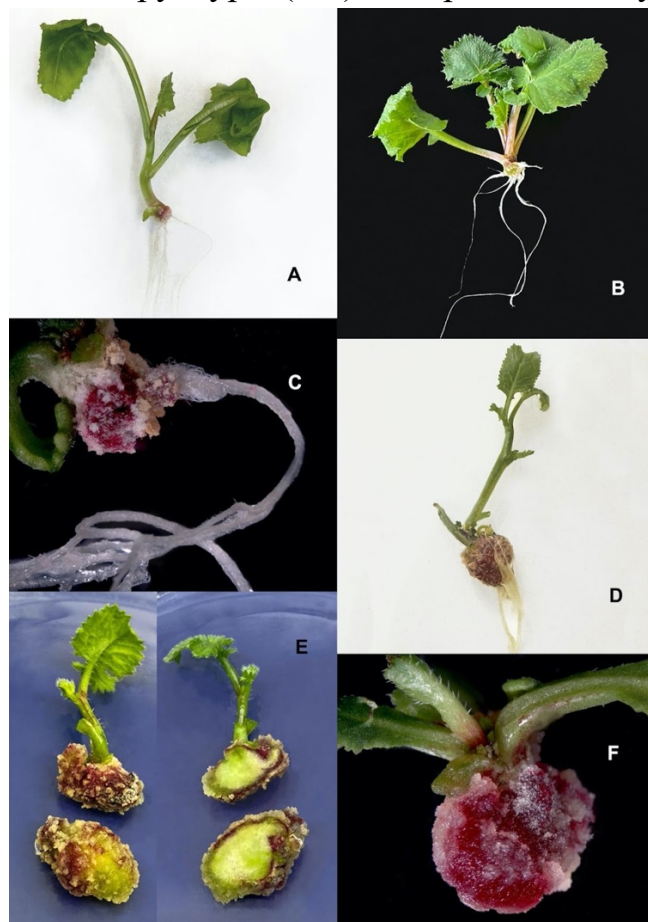


Рисунок 5 – Типы корневой системы ДН-растений РЕ:

А, В – нормальная корневая система – I тип; С, D – корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухольями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; Е, F – КС с ВО без корней – III тип.

Если формировались КС с ВО, то корневая система либо полностью отсутствовала (Рисунок 5, тип III), либо состояла из единичных корней, сформированных на поверхности КС с ВО (Рисунок 5, тип II). При адаптации в условиях *in vivo* растения третьего типа погибали. Растения II типа выживали от 0 до 35% случаев в зависимости от генотипа, т. к. КС с ВО в процессе роста чаще всего формируют спиральные, волнистые, неравномерно распределенные сосуды, и питание растений через корни, сформированные на поверхности КС с ВО, нарушено. В результате укоренения ДН-растений РЕ в условиях *in vivo* выжило от 0 до 14% от общего количества микропобегов в эксперименте в зависимости от генотипа.

Эксперимент оценке влияния добавления гормонов роста в ПС для регенерации на ризогенез микропобегов РЕ показал, что существенных отличий между культивированием микропобегов на средах с добавлением гормонов и на средах без гормонов обнаружено не было, то есть РЕ не чувствителен к добавлению гормонов роста в ПС на этапе ризогенеза.

Оптимизация технологии укоренения микропобегов РЕ

Влияние различных техник посадки микропобегов РЕ на эффективность ризогенеза при культивировании на твердой безгормональной среде МС. В эксперименте использовали три варианта посадки, представленные на рисунке 6. В результате исследования было показано (Таблица 7), что при третьем

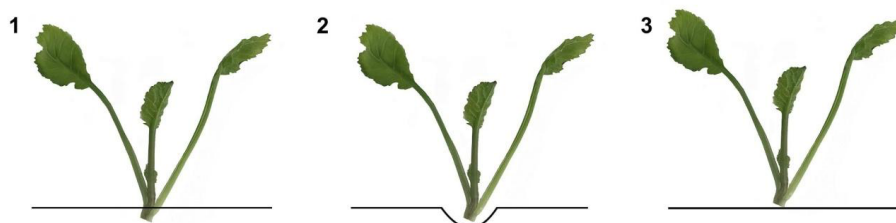


Рисунок 6 – Способы посадки микропобегов редиса европейского:

1 – посадка микропобега с погружением гипокотыля на 2-3мм в твердую питательную среду МС; 2 – посадка МП в лунку, сделанную в питательной среде с помощью пинцета в стерильных условиях; 3 – посадка МП на поверхность твердой ПС для регенерации без заглубления.

Таблица 7 – Типы корневой системы МП РЕ и приживаемость растений-регенерантов в условиях *in vivo* (по типам корневой системы и генотипу и всего внутри каждого генотипа при различных способах посадки) в зависимости от генотипа и способов посадки МП

Номер ДН-линии (генотип)	Среднее число растений-регенерантов по трем сериям опытов, шт.								
	I тип корневой системы			II тип корневой системы			III тип корневой системы		
	Способ посадки			Способ посадки			Способ посадки		
	№1	№2	№3	№1	№2	№3	№1	№2	№3
1	1.3 b	1.6 b	6.3 a	3.0 b	5.7 a	3.6 b	5.7 a	2.7 b	0.0 c
2	0.0 c	1.3 b	7.3 a	2.7 a	2.0 a	2.3 a	7.3 a	6.7 a	0.3 b
3	0.0 b	0.0 b	8.7 a	3.7 a	4.7 a	1.3 b	6.3 a	5.3 a	0.0 b
Среднее	0.43	0.97	7.43	3.13	4.13	2.40	6.43	4.90	0.10
Из них укоренилось в условиях <i>in vivo</i> , %									
1	100	100	100	0	23.5	54.5	0	0	-
2	-	100	100	0	33.3	42.9	0	0	-
3	-	-	100	36.4	35.7	66.7	0	0	-
Итого укоренилось в условиях <i>in vivo</i> , от общего числа микропобега в опыте, %									
	Способ посадки №1			Способ посадки №2			Способ посадки №3		
1	12			30			81		
2	0			23			85		
3	14			15			90		
Двухфакторный дисперсионный анализ по типам корневых систем в зависимости от генотипа и способа посадки:									
Факторы	Значение сумм квадратов (SS) /Доля влияния фактора, %								
Генотип	нз/ 0.30/ 0.1%			**/ 14.22/ 22%			***/ 18.07/ 8%		
Способ посадки	***/ 272.52/ 91%			**/12.67/ 20%			***/ 196.07/ 84%		
Генотип x Способ посадки	*/ 16.15/ 5%			*/17.11/ 26%			*/11.26/ 5%		
Случайные факторы	12.00/ 4%			20.67/ 31%			8.7/ 4%		

Нормальная корневая система – I тип; корнеплодоподобные структуры (КС) с вторичными опухолями (ВО) со слабой корневой системой – II тип; КС с ВО без корней – III тип. *, ** и ***: отличия значимы на 5%, 1% и 0,5% уровнях вероятности, соответственно, нз: не значимы. Варианты, отмеченные одной и той же строчной буквой (сравнение числа растений-регенерантов в зависимости от способа посадки в пределах одного типа корневой системы и одного генотипа), не имеют значимых различий с вероятностью 95% согласно тесту Дункана (MRT). Долю влияния факторов рассчитывали, как отношение SS каждого фактора к общей SS.

способе посадки формирование нормальной корневой системы (I тип) было гораздо чаще, чем при способах посадки № 1 и № 2, более того, в случае формирования II типа корневой системы, КС с ВО были небольшого размера (до 3-4 мм в диаметре), что позволило повысить процент укоренения микропобегов с таким типом корневой системы с 0-37% до 43-67% (Таблица 7).

Таким образом, третий способ посадки микропобегов РЕ увеличил долю растений, успешно прошедших адаптацию и укоренившихся в естественных условиях, до 81–90%.

Влияние последовательных пересадок микропобегов РЕ с иссечением корнеплодоподобных структур в области гипокотилия при культивировании на твердой безгормональной среде МС. Несмотря на то, что в предыдущей серии опытов удалось значительно повысить эффективность укоренения микропобегов, представляло интерес разработать методику укоренения растений-регенерантов с уже сформированными КС с ВО. Для этого применяли пересадки микропобегов с иссечением КС с ВО. В результате проведенных экспериментов было отмечено, что при иссечении аномальных структур образование корневой системы наблюдалось примерно в 50% случаев уже после первой пересадки, независимо от того, каким способом они были посажены на питательную среду ранее. Для растений, которые повторно образовывали КС с ВО, пересадки продолжали (до шести раз), в результате чего около 90% всех микропобегов в опыте сформировали мощную корневую систему и успешно укоренилось в условиях *in vivo*. Таким образом, разработанная методика посадки (в среду без заглубления) в сочетании с последовательным удалением КС с ВО улучшает корнеобразование у микропобегов РЕ и увеличивает процент растений, успешно прошедших адаптацию в условиях *in vivo* с 0–14% до 95–98%.

Изучение эффективности ризогенеза микропобегов РЕ при культивировании на жидкой питательной среде с последовательными пересадками с иссечением корнеплодоподобных структур в области гипокотилия. Как и на этапе индукции эмбриогенеза, был применен нестандартный подход к подбору питательных сред, в результате чего для РЕ была протестирована жидкая ПС МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 2% сахарозой, которая обычно применяется для моркови столовой. Культивирование микропобегов РЕ на бумажных мостиках в жидкой ПС снижало относительный процент образования КС и ВО и повышало процент микропобегов с нормальным корнеобразованием. КС с ВО на мостиках часто были небольшого размера и формировали развитую корневую систему, благодаря чему смогли адаптироваться *in vivo*. В результате культивирования МП на жидкой ПС удалось укоренить в условиях *in vivo* от 75 до 93% ДН-растений. После дополнения такого культивирования пересадками с иссечением КС с ВО было укоренено 97% от всего числа МП в опыте.

3.4 Определение ploидности растений-регенерантов

Анализ полученных растений-регенерантов показал, что около 70% растений были удвоенными гаплоидами, около 5% – гаплоидами, около 20% растений были с нарушениями ploидности (миксоploидия, анеуплоидия) и около 5% растений были полиploидами. Таким образом, для растений-регенерантов РЕ не требуется дополнительный этап удвоения набора хромосом антимиототическими агентами.

3.5 Практические результаты

В результате проведенной работы была разработана ИМС технология для РЕ, которая впервые позволила завершить полный цикл получения удвоенных гаплоидов РЕ (Рисунок 7) и получить ДН-линии РЕ за 1–2 года, что в два-четыре раза быстрее в сравнении с традиционными методами селекции (Рисунок 8).

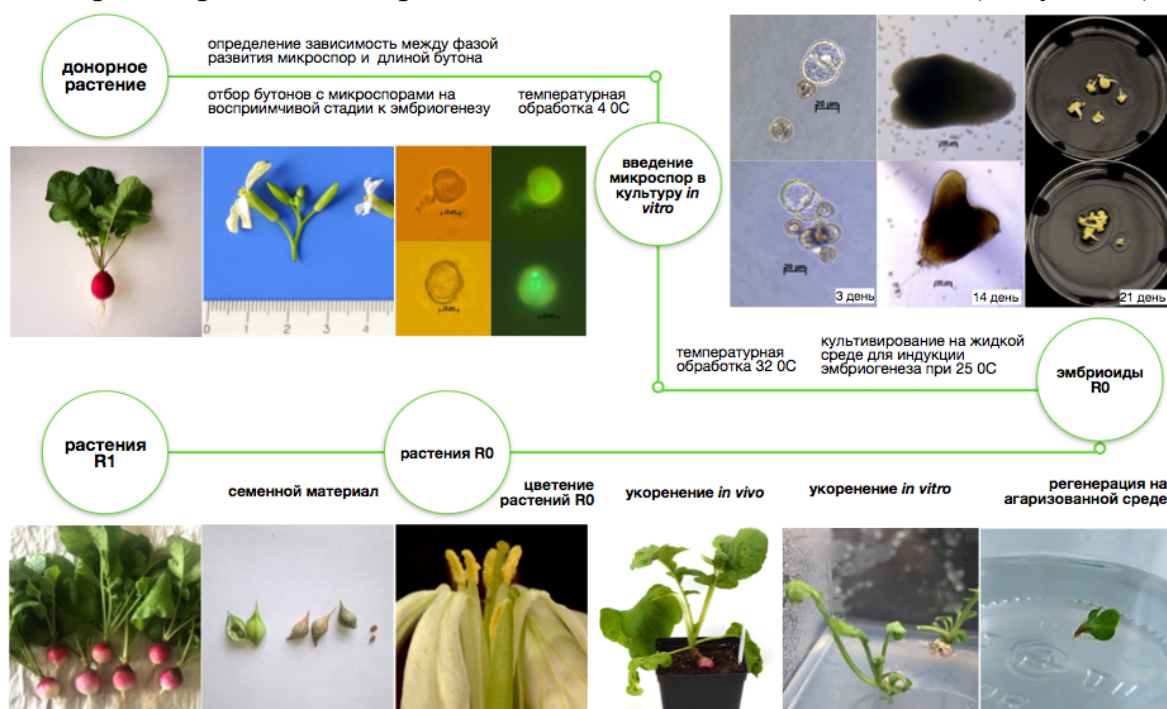


Рисунок 7 – Полный цикл получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro*, на примере сортообразца редиса европейского РБК

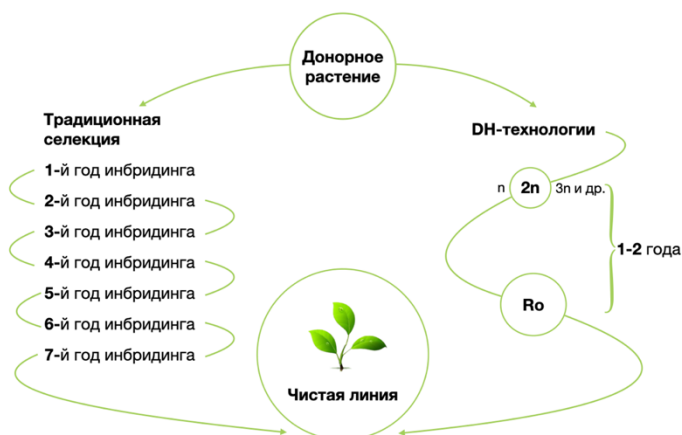


Рисунок 8 – Схема получения гомозиготных линий традиционными методами селекции и с помощью ДН-технологий (культуры изолированных микроспор *in vitro*)

Таким образом, в результате выполненной работы из полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro* растений по селекционно-ценным признакам было выделено три ДН-линии РЕ и получено их семенное потомство R₀, которое было передано селекционерам ФГБНУ ФНЦО и включено в работу по созданию линейного материала для гибридов F₁ (Рисунок 9).



Рисунок 9 – ДН-линии редиса европейского: Веня, Персей, Жегалов (слева-направо), полученные в культуре изолированных микроспор *in vitro*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что эмбриогенез РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* имеет ряд особенностей биологического развития, ранее не отмеченных для других культур семейства Brassicaceae: упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента.

2. В процессе разработки новых методических подходов и подбора критических факторов на разных этапах эмбриогенеза, регенерации эксплантов, ризогенеза *in vitro* и укоренения *in vivo*:

- показана генотип-специфичность линейного размера бутона РЕ с оптимальными стадиями развития микроспор для ИМС культуры;

- выявлена высокая неоднородность популяции микроспор по стадиям развития в бутонах РЕ, что может являться одной из главных причин низкой отзывчивости РЕ к ИМС технологии;

- разработан оригинальный способ изоляции микроспор, который позволяет повысить урожайность эмбриоидов РЕ в среднем в 3 раза в сравнении со стандартным способом изоляции (оформлена заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae» (заявка № 2022114090/10 (029482) от 25.05.2022 г.);

- подобрана оптимальная продолжительность температурного шока 32°C для РЕ, которая составляет 1–2 суток в зависимости от генотипа;

- впервые показана высокая эффективность ПС МС с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина для индукции эмбриогенеза РЕ и генотип-

специфическая отзывчивость сортообразцов РЕ к эмбриогенезу в зависимости от состава питательной среды для индукции;

- выявлено, что на этапе регенерации прямого прорастания эмбриоидов не происходит, и для индукции вторичного эмбриогенеза и побегообразования в ПС следует добавлять 1,0 мг/л БАП или 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК;

- на этапе индукции корнеобразования в условиях *in vitro* обнаружена биологическая особенность микропобегов РЕ - высокая склонность к образованию корнеплодоподобных структур (опухолеобразование) в области гипокотилия при использовании стандартной методики укоренения, что препятствует формированию нормальной корневой системы и может приводить к полной потере растений;

- показано отсутствие стимулирующего эффекта добавления ауксинов в твердую питательную среду на корнеобразование у микропобегов РЕ;

- разработан оригинальный методический подход повышения эффективности ризогенеза микропобегов РЕ, основанный на способе посадки микропобегов на агаризованную среду для регенерации, который позволил повысить долю растений, прошедших адаптацию в условиях *in vivo* с 0–14% (при стандартной методике укоренения) до 81–90%;

- впервые для семейства Brassicaceae показана перспективность использования жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе укоренения микропобегов с целью снижения образования корнеплодоподобных структур в области гипокотилия, что позволяет повысить процент адаптированных растений в условиях *in vivo* до 75–93%;

- доказана эффективность применения последовательных пересадок микропобегов с иссечением корнеплодоподобных структур до образования нормальной корневой системы для растений РЕ с повышенной склонностью к опухолеобразованию, что в совокупности с разработанным способом посадки микропобегов на твердую питательную среду МС и/или с применением жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина позволило повысить процент успешно укоренившихся растений в условиях *in vivo* до 95–98%.

3. Выявлена высокая склонность растений-регенерантов РЕ к спонтанному удвоению набора хромосом, в связи с чем отсутствует необходимость в дополнительном трудоемком этапе – обработке антимиотическими агентами.

4. С помощью разработанного ИМС протокола были получены ДН-линии РЕ и их семенное потомство Ro, из которого было выделено три ДН-линии РЕ с селекционно ценными признаками. Показано, что срок создания гомозиготной линии РЕ с помощью разработанной ИМС технологии (1–2 года) в два-четыре раза быстрее традиционных методов селекции. Полученные ДН-линии РЕ

можно использовать для селекции сортов и гибридов F₁ и/или для генетических исследований.

Таким образом, в процессе выполнения диссертационной работы получены новые фундаментальные знания о биологии андрогенеза РЕ, найдены оригинальные методические решения и модифицированы элементы ДН-технологии, разработан протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для РЕ и впервые в мире получены ДН-линии этой культуры.

Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы

Для успешного получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* рекомендуется:

- рекогносцировочное определение оптимального размера бутонов для каждого генотипа РЕ перед этапом изоляции;
- изоляцию микроспор проводить путем поперечного разреза скальпелем каждого бутона с последующим взбалтыванием половинок бутонов на ротационном шейкере Mini-Centrifuge/Vortex FV-2400 Micro-Spin в стерильных пробирках с жидкой питательной средой NLN-13 в течение 1–30 секунд (время экспозиции подбирается индивидуально);
- в качестве среды для индукции эмбриогенеза использовать питательные среды NLN-13 или МС-13 (подбирать индивидуально для каждого генотипа);
- продолжительность термообработки 32°C для культуры микроспор РЕ подбирать эмпирически из временных экспозиций 1–2 суток;
- для индукции побегообразования РЕ использовать среды МС с 2% сахарозы, 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК, 7 г/л агара и/или МС с 2% сахарозы, 0,1 мг/л БАП, 7 г/л агара (подбирать индивидуально для каждого генотипа);
- укоренение микропобегов РЕ проводить в пробирках с жидкой ПС МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на мостиках из фильтровальной бумаги и/или на безгормональной среде МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара с посадкой микропобегов без заглубления;
- в случае образования корнеплодоподобных структур (КС) в области гипокотилия микропобегов – удалить КС скальпелем в стерильных условиях и повторно пересадить микропобег в новый культуральный сосуд/пробирку с твердой средой МС или жидкой средой МСм, соответственно.

Перспективы дальнейшей разработки темы состоят:

- в дальнейшей оптимизации разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для РЕ с целью повышения ее эффективности;

- в изучении особенностей процесса спонтанной дупликации хромосом растений-регенерантов РЕ в процессе культивирования в условиях *in vitro* (в зависимости от факторов продолжительности культивирования, состава питательной среды и пр.) для получения новых фундаментальных знаний и поиска новых способов удвоения хромосом без применения антимиотических агентов;

- в дальнейшем изучении причин опухолеобразования у микропобегов РЕ в области гипокотилия в разных условиях культивирования с целью определения биологических механизмов данной аномалии;

- в исследовании эндогенных механизмов регуляции корнеобразования при различных способах культивирования микропобегов на питательных средах.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи

1. Kozar E. V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish / E. V. Kozar, E. A. Domblides, A. V. Soldatenko // Vavilov journal of Genetics and Breeding. – 2020. – Vol. 24. – № 1. – P. 31–39.

2. Kozar E. V. Rooting technique of double haploids obtained in culture of microspore *in vitro* for European radish / E. V. Kozar, E. G. Kozar, A. V. Soldatenko, E.A. Domblides // Vegetable crops of Russia. – 2020. – № 5. – P. 3–15.

3. Kozar E. V. Protocol of European Radish (*Raphanus sativus* L.) Microspore Culture for Doubled Haploid Plant Production / E. V. Kozar, E.A. Domblides // In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, NY. – 2021. – Vol. 2288. – P. 217–232.

4. Kozar E. Brassica rapa L. ssp. chinensis Isolated Microspore Culture Protocol / D. Shumilina, E. Kozar, O. Chichvarina, K. Korottseva, E. Domblides // In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, NY. – 2021. – Vol. 2288. – P. 145–162.

5. Kozar E. V. Embryogenesis of European Radish (*Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *Radicula*) in culture of isolated microspores *in vitro* / E. V. Kozar, E. A. Domblides, A. V. Soldatenko // Plants. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 2117.

6. Kozar E. V. Effect of the method of microspore isolation on the efficiency of isolated microspore culture *in vitro* for Brassicaceae Family / E. V. Kozar, E.G. Kozar, E.A. Domblides // Horticulture. – 2022. – Vol. 8. – №10. – P. 864.

Патенты

В настоящий момент идет регистрация трех патентов на селекционные достижения по ДН-линиям РЕ, полученным с помощью ИМС технологии (Жегалов заявка от 13.07.2022 г. № 86648/ 7754534, Веня заявка от 13.07.2022 г. № 86649/ 7754535, Персей заявка от 13.07.2022 г. № 86647/ 7754533). Подана заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в

культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae» (заявка от 25.05.2022 № 2022114090/10 (029482)).

Прочие издания–материалы конференций

7. Kozar E. V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops / E.A. Domblides, N.A. Shmykova, D. V Shumilina, T. V. Zayachkovskaya, T.S. Vjurtts, E. V. Kozar, L.Y. Kan, V.S. Romanov, A.S. Domblides, V.F. Pivovarov // VIII International Scientific Agriculture Symposium «Agrosym 2017». – Jahorina, Bosnia and Herzegovina: Book of Abstracts. – 2017. – P. 177.

8. Козарь Е.В. Получение удвоенных гаплоидов редиса в культуре микроспор *in vitro* / Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А. В. Солдатенко // XVIII Всероссийская конференция молодых учёных, посвященная памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва: Сборник тезисов: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. – 2018. – P. 123–125.

9. Kozar E. Obtaining double haploids of radish in culture microspore *in vitro* / E. Kozar, E. Domblides, A. Soldatenko // 2nd Mediterranean Forum for PhD students and Young Researchers. Research and Innovation as Tools for Sustainable Agriculture, Food and Nutrition Security. – Bari, Italy. – 2018. – P. 89.

10. Козарь Е.В. Оценка уровня ploидности удвоенных гаплоидов редиса, полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro* / Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А. В. Солдатенко, А.С. Домблидес // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – Vol. 37. – P. 31–31.

11. Козарь Е.В. Особенности редиса европейского при получении ДН- растений в культуре микроспор *in vitro* / Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А. В. Солдатенко // Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2020). – 2020. – P. 81.

12. Козарь Е. В. Особенности эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*. / Е. В. Козарь // Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР: материалы Всероссийской научно-практической конференции / под ред. Ю. В. Ухатова, Е. А. Соколова. – Санкт-Петербург: тезисы докладов: научное электронное издание. – 2022. – P. 233.