

Эмбриониды моркови (*D. 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, Москва

maria.fomicheva.1@yandex.ru

Получение удвоенных гаплоидов моркови столовой (*D. 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

Цель: разработать протокол удвоения генома моркови столовой

Финансирование: РНФ № 23-76-01034

Статья по данной работе:

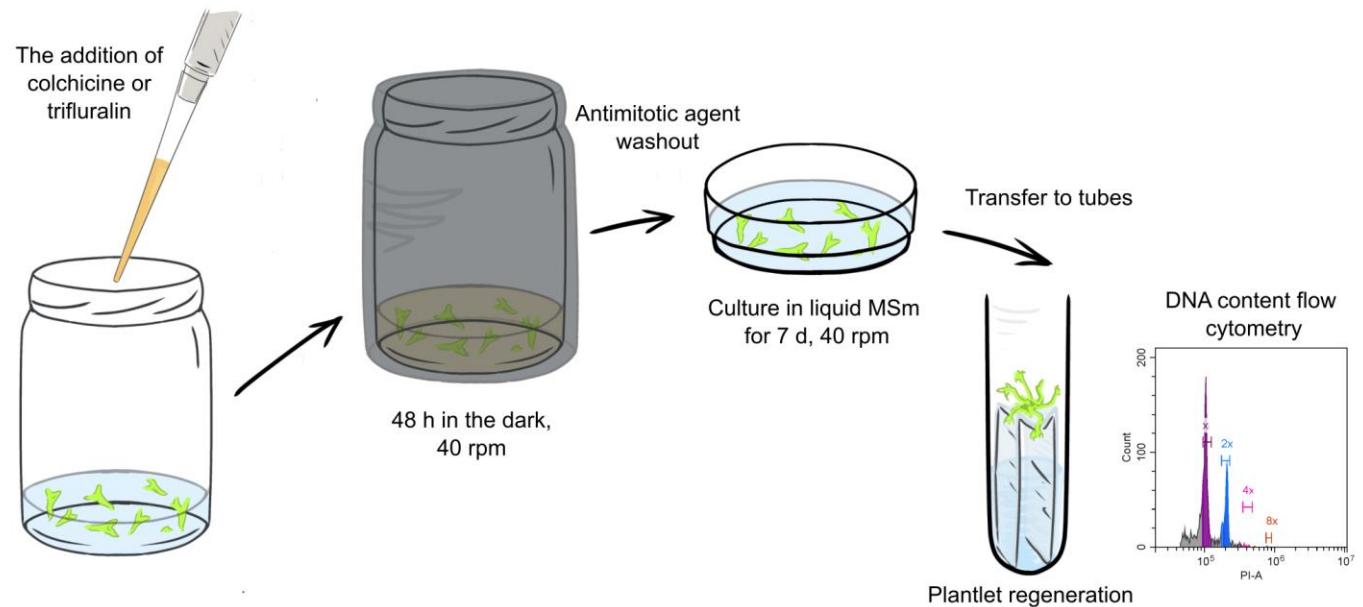


Материалы и методы:

Обработка антимитотическими агентами проводилась **на стадии эмбриоидов**, что не тестировалось ранее в литературе:



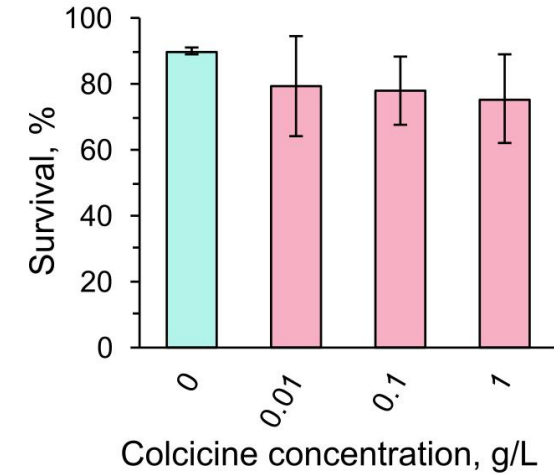
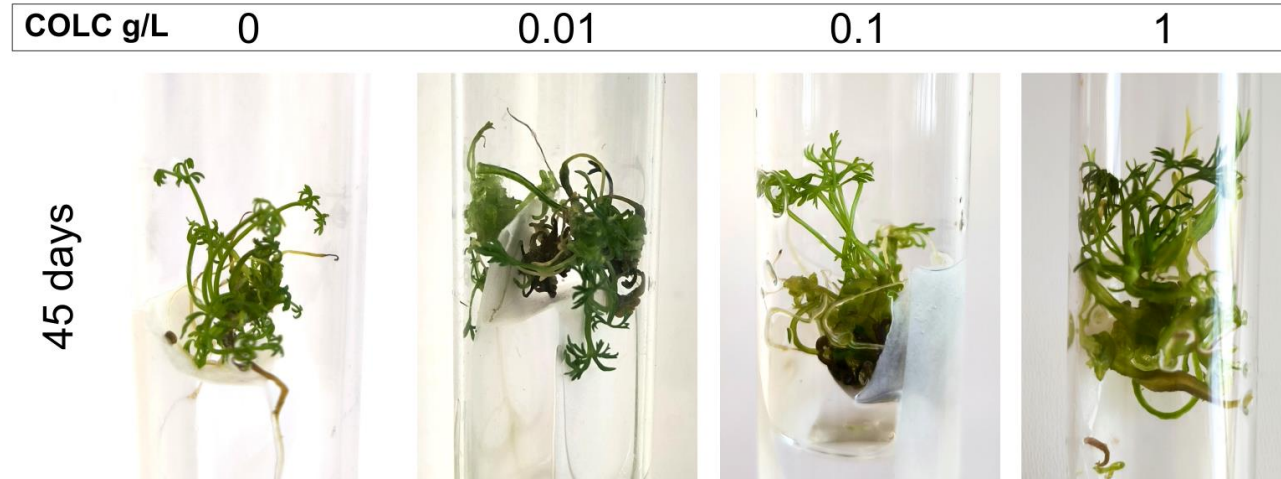
Эмбриониды культивировались **на среде MSm с 0.1 г/л кинетином**



Анализ ploидности проводился с помощью **проточного цитометра**

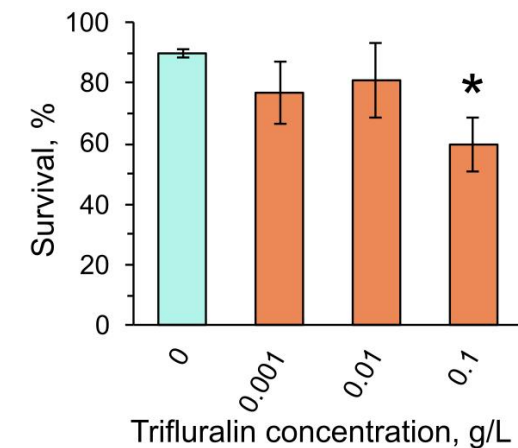
Оценка токсичности антимитотических агентов для эмбрионов моркови

0,01 – 1 г/л колхицин не нарушает развитие моркови

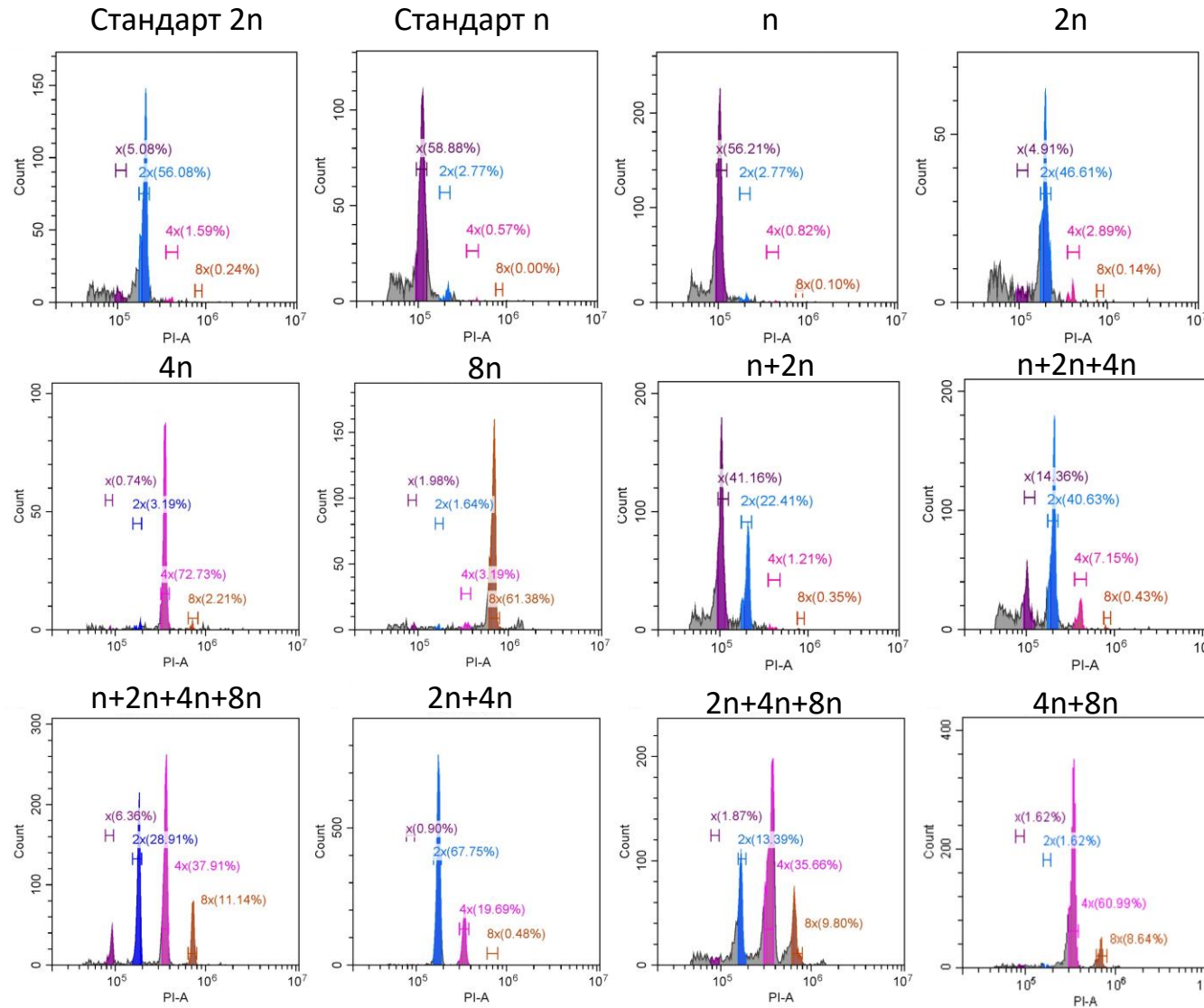


0,001 – 0,01 г/л трифлуралин не оказывал токсического действия

0,1 г/л трифлуралин снижал выживаемость и замедлял регенерацию



Цитометрический анализ выявлял разные варианты ploidy после обработки антимиотическими агентами



Выявлялись гаплоиды (не прошло удвоение)
Диплоиды, тетраплоиды, октаплоиды

Также обнаруживались различные миксоплоиды

Распределение разных вариантов плоидности после обработки различными концентрациями антимиотических агентов

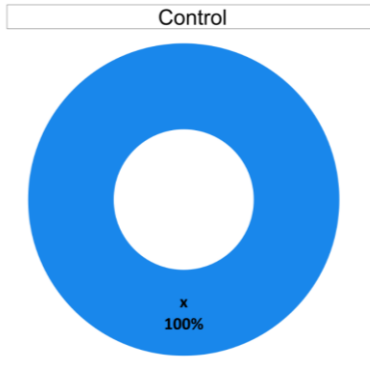
Статистический анализ проводился с помощью метода хи-квадрат

A

Agent	Treat-ment, g/L	Total	x and higher than 2x (%)	2x and mixoploids with 2x (%)	Chi-square test
-	0	36	36 (100)	0 (0) ^a	
COLC	0.01	35	22 (63)	13 (37) ^b	$\chi^2=53.97$ df=6 p<0.0001
	0.1	29	15 (52)	14 (48) ^b	
	1	32	14 (44)	18 (56) ^b	
TR	0.001	34	17 (50)	17 (50) ^b	Multiple comparisons: ^{ab} p<0.0001 ^{bb} p>0.05
	0.01	39	10 (26)	29 (74) ^b	
	0.1	32	9 (28)	23 (72) ^b	

Спонтанного удвоения не наблюдалось в контроле:

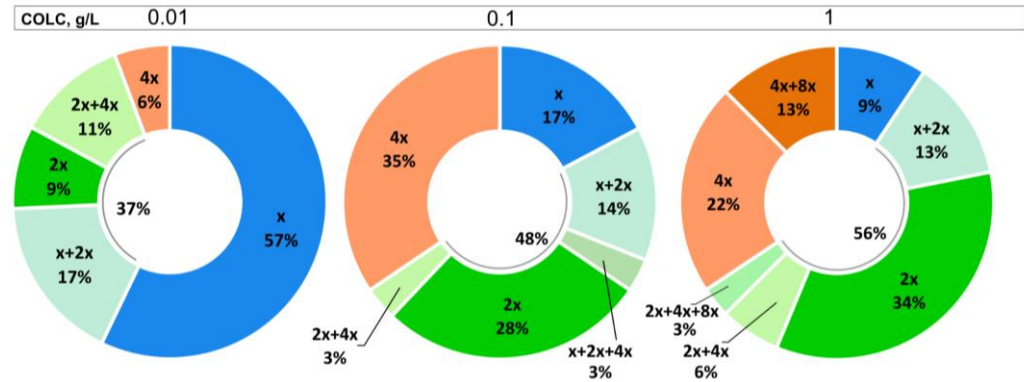
B



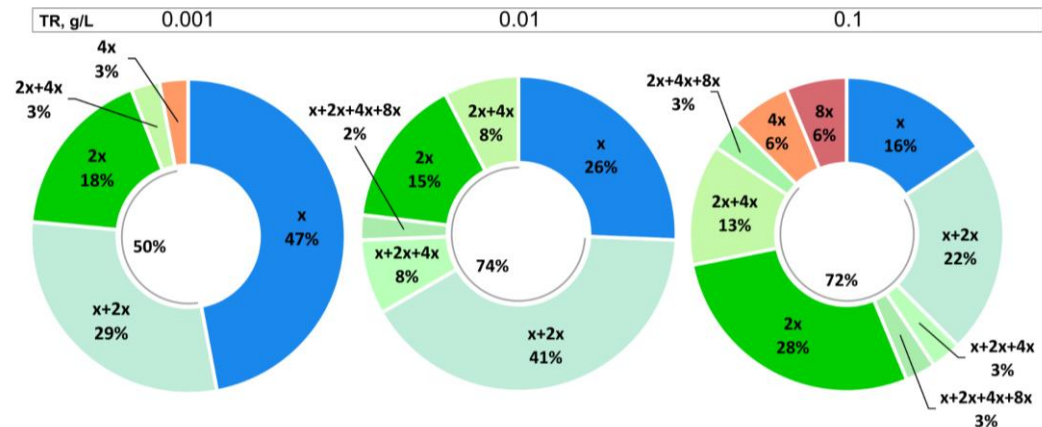
КОЛХИЦИН

Удвоение при различных концентрациях колхицина и трифлуралина:

C



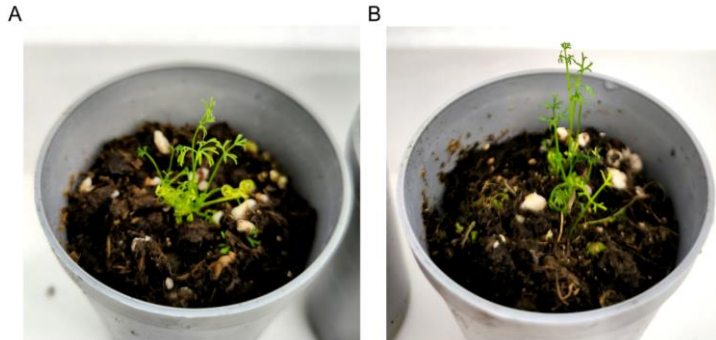
D



трифлуралин

Выводы

- Впервые мы протестировали обработку моркови антимиотическими агентами на стадии эмбриоидов. Интенсивный вторичный эмбриогенез эмбриоидов моркови позволил нам получить большое число эмбриоидов одного генотипа - не менее 30 штук на каждую концентрацию антимиотического агента. Малый размер эмбриоидов позволяет проводить обработки в небольших объемах с минимальным количеством реагентов.
- 0,01 – 1 г/л колхицин не нарушает развитие моркови. Трифлуралин не оказывал токсического действия при концентрациях 0,001 – 0,01 г/л, но 0,1 г/л трифлуралин снижал выживаемость в среднем на 40% и замедлял регенерацию проростков. При концентрации 1 г/л трифлуралина все эмбриоиды погибали.
- С помощью проточной цитометрии мы показали, что 0,01 - 1 г/л колхицин и 0,001 - 0,1 г/л трифлуралин могут удваивать геном моркови. Самый высокий процент диплоидов наблюдался при 1 г/л колхицина (34%) и 0,1 г/л трифлуралина (28%). Самый высокий процент диплоидов вместе с миксоплоидами (частичными диплоидами) был при обработке 0,01 и 0,1 г/л трифлуралином (более 70%) и 1 г/л колхицином (56%).
- При повышении концентрации антимиотических агентов снижалось число гаплоидных растений, и при этом повышалось число растений с большей плоидностью, в том числе количество тетраплоидов и октоплоидов.
- 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.



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