

ПОЛУЧЕНИЕ ДВОЙНЫХ ГАПЛОИДОВ У РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ *BRASSICA NAPUS* В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

Нескородов Я.Б.¹, Мишуткина Я.В.¹, Кабардаева К.В.¹, Тураев А.М.²

¹ФГБУН «Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 1), e-mail: yaroslav.neskorodov@biengi.ac.ru

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия (119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1), e-mail: Alisher.Touraev@viscea.org

Целью настоящего исследования было сравнение и оценка разработанных ранее протоколов для получения удвоенных гаплоидов рапса через классический эмбриогенез и через образование суспензорподобных структур на различных сортах отечественной селекции. Достоверных отличий в эффективности формирования эмбриоидов между двумя методиками отмечено не было. Было показано, что оба метода достаточно эффективны для использования на сортах рапса отечественной селекции. Частота регенерации и выход удвоенных гаплоидов с использованием данных методов был не намного ниже, чем у контрольного сорта Топаз, который считается лидером по эффективности получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор. Так, эффективность регенерации растений из эмбриоидов, полученных через классический эмбриогенез у отечественных сортов, составила от 10 до 58%, а через образование суспензорподобных структур - 18-69%. Частота регенерации в контроле (Топаз) составила 61% и 76%, соответственно. Абсолютное количество двойных гаплоидов было достаточным в обоих методах, чтобы использовать их для селекционных программ большинства отечественных сортов.

Ключевые слова: рапс, *Brassica napus*, гаплоиды, удвоенные гаплоиды, культура микроспор, *in vitro*, эмбриогенез, регенерация.

PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOIDS IN DOMESTIC VARIETIES OF *BRASSICA NAPUS* VIA ISOLATED MICROSPORE CULTURES

Neskorodov Y.B.¹, Mishutkina Y.V.¹, Kabardaeva K.V.¹, Touraev A.M.²

¹Centre "Bioengineering" RAS, Moscow, Russian Federation (117312, pr-t 60-letiya Oktyabrya, 7/1), e-mail: yaroslav.neskorodov@biengi.ac.ru

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation (119991, Moscow, Leninskie Gory, GSP-1), e-mail: Alisher.Touraev@viscea.org

The aim of this research was the comparison and evaluation of two established earlier methods of obtaining doubled haploid rapeseed, classical microspore embryogenesis and embryogenesis via the formation of suspensor like structures, in various Russian varieties. We did not observe significant differences in the frequency of embryo formation and regeneration of plants between two protocols. Thus, both methods can be used to obtain doubled haploid plants in tested Russian varieties. The frequency of embryo formation and regeneration of plants were a little lower compared to the control variety, *Brassica napus* cv. Topas, which is known to be the most effective variety for doubled haploid production via microspore cultures in rapeseed. The frequency of regenerated plants from formed embryos was from 10% till 58% in classical methods and, from 18 till 69% - in the methods, based on the use of suspensor like structures, whereas the frequency of regeneration in Topas reached 61%. The total number of regenerated plants was enough to use both methods to obtain necessary number of doubled haploids in all varieties, tested for the use in the breeding programs.

Keywords: rapeseed, *brassica napus*, haploids, doubled haploids, microspores, *in vitro*, embryogenesis, regeneration.

Введение

Несмотря на то что методика культивирования и индукции эмбриогенеза в микроспорах рапса достаточно рутинна, существуют две проблемы, которые ограничивают более широкое её использование, а именно: 1) высокая зависимость процесса эмбриогенеза от генотипа растения; 2) вторичный и часто аномальный эмбриогенез [1; 3; 7].

Недавно на *Brassica napus* cv. Топаз было показано, что при определенных условиях (при правильном подборе параметров температурного шока) через 8-9 дней культивирования происходит разрыв стенки микроспоры и образуется нитевидная структура, состоящая из отдельных рядов клеток (суспензорподобная структура) [6]. В последующие дни происходит продольное деление верхней периферической клетки и формируется эмбрионоподобная структура. Эмбрионы, развившиеся подобным образом, абсолютно идентичны с зиготическими зародышами и способны развиваться в нормальные растения, а их развитие происходит гораздо быстрее, чем обычно. Данная технология была использована на сорте Топаз и описана в деталях исследователями из Нидерландов [6] как удобная модель для изучения механизма эмбриогенеза. Недавно эта методика показала свою эффективность на сортах рапса иностранной селекции (Resch и Touraev, неопубликованные результаты).

Целью настоящего исследования было сравнение и оценка протоколов получения удвоенных гаплоидов рапса, через классический эмбриоидогенез и через образование суспензорподобных структур, на различных сортах отечественной селекции.

Материалы и методы исследования

Растительный материал. В эксперименте использовались отечественные сорта рапса (*Brassica napus* cv) ярового: Ратник, Викинг, Таврион, и озимого: Оникс, Метеор, Дракон. Сорт рапса Топаз был использован в качестве положительного контроля, так как для него уже существует эффективный протокол получения удвоенных гаплоидов.

Среды для культивирования. Для выделения микроспор была использована жидкая среда В-5 [2], содержащая макро- и микросоли, Fe-EDTA, 100 мг/л миоинозитола и 10% сахарозы. Для культивирования микроспор и индукции эмбриогенеза была использована жидкая среда NLN-13 [4] с содержанием сахарозы 13%.

Выделение микроспор. Цветочные бутоны *Brassica napus* cv. (длиной 3,2-3,5 мм), содержащие микроспоры на поздней одноядерной или на ранней двуядерной стадии развития пыльцы, были поверхностно простерилизованы 70%-ным этанолом в течение 30 секунд и затем трижды промыты холодной (4 °С) стерильной водой. Бутоны были осторожно мацерированы с помощью шпателя в 1,5 мл жидкой холодной (4 °С) среды В-5 для высвобождения микроспор из пыльников и после этого ресуспендированы в 10 мл среды В-5 (4 °С). Суспензия была отфильтрована через 40-мкм нейлоновый фильтр в стерильную центрифужную пробирку для удаления тканей пыльника. Затем суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут для очистки микроспор от мелких частей пыльника. Супернатант удаляли, а осажденные микроспоры промывали путем двукратного центрифугирования в холодной среде В-5 по 3 мин при 1000 об/мин.

Осажденные микроспоры ресуспендировали в среде NLN-13 до плотности 4×10^4 на 1 мл среды и культивировали в плашках (6 лунок, NUNC, Denmark) в темноте при температуре:

1) 30 °С в течение 3 дней (температурный шок) для индукции классического эмбриоидогенеза;

2) при температуре 33 °С в течение 18 часов для индукции образования суспензорподобных структур.

Эмбриогенез и регенерация растений. После периода воздействия высокими температурами микроспоры переносили на медленно вращающийся шейкер (50 rpm) в темноту на 25 °С и культивировали до тех пор, пока эмбрионы не были видны невооруженным глазом (10-14 дней). После этого хорошо развитые эмбрионы переносили на твердую среду, содержащую соли и витамины Мурасиге-Скуга [5], 10% сахарозу, 10% глюкозу, 0.5% активированный уголь и 0.7% растительный агар.

Обработка колхицином и культивирование растений. Обработка колхицином проводилась на уровне проростков, содержащих 2-3 листа в стерильных контейнерах с вермикулитом, смоченным жидкой ½ B5 средой, содержащей раствор колхицина (0.5% колхицин + 0.1% DMSO). Культивирование осуществляли при температуре 20-23 °С с 16-часовым фотопериодом в течение 2 суток. После обработки колхицином растения переносили в стерильные контейнеры со ½ B5 средой без колхицина и культивировали при тех же условиях в течение 2 недель. Затем растения переносили в почву и доращивали до стадии 4 листьев, после чего проводили яровизацию растений при 6 °С, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения 5 тыс. люкс в течение 6 недель.

Анализ плоидности. Для анализа плоидности использовали листья растений, сформированные после обработки колхицином. Плоидность определяли с использованием проточного цитометра фирмы Partec по стандартному протоколу фирмы-производителя (N05-5003 CyStain UV Precise T).

Результаты исследования и их обсуждение

Нами было проведено сравнение двух методик получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса (классический эмбриоидогенез в культуре микроспор и эмбриоидогенез микроспор через формирование суспензорподобных структур) на сортах отечественной селекции. Сорт Топаз (Topaz) был использован в качестве положительного контроля.

Эмбриогенез микроспор рапса в культуре *in vitro* является результатом переключения развития микроспоры с гаметофитного на спорофитный путь после теплового стресса. Подобное воздействие первоначально вызывает формирование тотипотентной эмбрионной микроспоры с характерными цитологическими особенностями (ядро в центре вакуолизированной клетки), которая при переносе на богатую среду и нормальную

температуру начинает делиться симметрично и формирует многоклеточную структуру, покрытую наружной оболочкой микроспоры (экзины) [6; 8; 10]. После выхода из экзины эти клеточные структуры развиваются последовательно в глобулярные, сердцевидные, торпедообразные и зрелые зародыши, способные к регенерации в целое растение после переноса в соответствующие условия [6; 9]. Этот путь обычно наблюдается у большинства растений, для которых разработана данная методика (табак, пшеница, ячмень, рапс и др.), и считается классическим эмбриоидогенезом.

Классический эмбриоидогенез в культуре микроспор отечественных сортов рапса. Через два дня после температурного шока 15-25% изолированных микроспор делились симметрично и от 2 до 5% популяции клеток через 10 дней развивались в глобулярно-сердцевидную стадию. Через две недели можно было наблюдать хорошо развитые зародыши, которые переносили на среду для регенерации гаплоидных проростков. На стадии 3-4 листьев проростки обрабатывают колхицином для получения удвоенных гаплоидов.

Эмбриоидогенез через образование суспензорподобных структур. На предварительных этапах исследования А.Тураевым было обнаружено, что уменьшение периода теплового стресса и увеличение температуры до 33 °С приводило к значительному увеличению частоты формирования суспензорподобных структур из микроспор, что полностью согласуется с оригинальными работами Supena и коллег [6]. При культивировании в течение 18 часов с использованием указанной температуры почти 50% микроспор образовывали суспензорподобные структуры, тогда как увеличение длительности теплового стресса приводило к уменьшению доли таких структур. Чувствительность к температурному стрессу варьировалась в зависимости от стадии развития культивируемых микроспор рапса. Было установлено, что оптимальная популяция микроспор должна состоять из 60% поздних одноклеточных микроспор.

Сравнение двух методов. Нами было установлено, что эмбрионы с суспензором развиваются медленнее. Так, микроспоры при классическом пути эмбриоидогенеза начинали деление уже на первый-второй день культивирования, через четыре дня они формировали проэмбрио, а на 8-й развивались до глобулярной и ранней сердцевидной стадии. Напротив, микроспоры, из которых развивались суспензорподобные структуры, начинали делиться только к 6-му дню, а на 8-й день состояли из 2-8 клеток. Через две недели культивирования зародыши без суспензора достигали стадии «торпеды» и составляли в длину 1-3 мм, тогда как зародыши с суспензором в это же время были в глобулярной или же в сердцевидной стадии.

Данные по эффективности методик на отечественных сортах рапса и в контроле приведены в таблицах 1-3. Эффективность формирования эмбриоидов через классический

эмбриогенез у отечественных сортов составила от 1,9 до 15,5 эмбриоида на используемый бутон. При этом эмбриогенез среди яровых сортов был выше, чем среди озимых. Эффективность в контроле (Топаз) составила 21,4 эмбриоида/бутон. Нами наблюдались аномалии в развитии зародышей, проявляющиеся в формировании вторичных эмбриоидов и каллусных структур.

Формирование эмбриоидов через образование суспензорподобных структур у отечественных сортов происходило с эффективностью 2,2-14,4 эмбриоида/бутон. При этом, так же как и в случае классического метода, эмбриогенез среди яровых сортов был выше, чем среди озимых. Эффективность в контроле (Топаз) составила 22,2 эмбриоида на почку.

Достоверных отличий в эффективности формирования эмбриоидов между двумя методиками отмечено не было, однако в случае, когда зародыши формировались через суспензорподобные структуры, они имели более классическое (зиготическое) строение и развивались без образования вторичных эмбриоидов и каллусных структур.

Таблица 1. Эффективность эмбриогенеза микроспор у различных генотипов рапса

Генотип	Классический метод		Через образование суспензорподобных структур	
	Количество выделений (успешных/общее)	Эффективность (эмбриоид/бутон)	Количество выделений (успешных/общее)	Эффективность (эмбриоид/бутон)
Ратник	9/10	3,3	11/13	3,1
Викинг	10/11	5,2	13/13	5,2
Таврион	8/8	15,5	10/11	14,4
Оникс	9/11	1,9	8/10	2,2
Метеор	8/9	6,3	6/7	5,9
Дракон	10/10	4,0	11/11	4,7
Средняя общая эффективность		6,0		5,9
Топаз	7/8	21,4	8/7	22,2

Через 2 недели после переноса эмбриоидов на твердую среду Мурасиге-Скуга проводили оценку эффективности регенерации. Эффективность оценивали по количеству нормальных зеленых растений-регенерантов.

Эффективность регенерации растений из эмбриоидов, полученных через классический эмбриоидогенез у отечественных сортов, составила от 10 до 58%. Эффективность в контроле (Топаз) составила 61%.

Регенерация растений из эмбриоидов, полученных через образование суспензорподобных структур, у отечественных сортов происходило с эффективностью 18-69%. Регенерация среди яровых сортов была выше, чем среди озимых. Эффективность в контроле (Топаз) составила 76%.

Общая средняя эффективность регенерации растений при использовании метода суспензорподобных структур была на 10% выше, чем при классическом методе.

Таблица 2. Эффективность регенерации растений из эмбриоидов у различных генотипов рапса

Генотип	Классический метод			Через образование суспензорподобных структур		
	Количество перенесенных зародышей	Число регенерированных растений	Регенерированные растения (%)	Количество перенесенных зародышей	Число регенерированных растений	Регенерированные растения (%)
Ратник	250	25	10	350	63	18
Викинг	615	141	23	422	156	37
Таврион	430	249	58	190	120	63
Оникс	151	51	34	150	63	42
Метеор	312	153	49	220	125	57
Дракон	164	89	54	140	97	69
Средняя общая эффективность			38			48
Топаз	172	105	61	150	114	76

Таким образом, можно сделать вывод о том, что оба метода подходят для использования на сортах рапса отечественной селекции. Уровень регенерации и выход удвоенных гаплоидов с использованием данных методов не намного ниже, чем у контрольного сорта Топаз, который считается лидером по эффективности получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор.

Полученные растения-регенеранты обрабатывали 0.5%-ным колхицином, и после образования новых листьев проводили анализ пloidности.

Эффективность получения удвоенных гаплоидов рапса среди отечественных сортов в среднем составила около 32%. У контрольного сорта Топаз эта величина составила 34%.

Таблица 3. Эффективность формирования удвоенных гаплоидов рапса после обработки 0,5%-ным колхицином

Генотип	Количество обработанных растений, шт.	Гаплоиды, шт.	Дигаплоиды, шт.	Полиплоиды, шт.	Уровень диплоидизации, %
Ратник	50	35	10	5	29
Викинг	50	24	18	8	51
Гаврион	50	29	19	2	41
Оникс	50	31	15	4	38
Метеор	50	36	14	0	28
Дракон	50	22	20	8	55
Среднее		59%	32%	9%	40
Топаз	50	27	17	6	46

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод о том, что оба метода могут быть с успехом использованы для получения гомозиготных двойных гаплоидов на сортах рапса отечественной селекции, исследованных в данной работе. Следует отметить, что в методике с использованием суспензорподобных структур эмбрионы выглядели и развивались без аномалий (формирование вторичных эмбриоидов и каллусных структур). Абсолютный выход растений был достаточным в обоих методах, чтобы использовать их для получения удвоенных гаплоидов большинства отечественных сортов. Уровень регенерации и выход удвоенных гаплоидов с использованием данных методов был не намного ниже, чем у контрольного сорта Топаз, который считается лидером по эффективности получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, соглашение № 8483.

Список литературы

1. Fletcher R., Coventry J., Kott L.S. Doubled haploid technology for spring and winter *Brassica napus* (revised edition). OAC Publications, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. - 1998. - P. 42.

2. Gamborg O. The effects of amino acid and ammonium on the growth of plant cells in suspension cultures // *Plant Physiol.* - 1970. - Vol. 45. - P. 372–375.
3. Lichter R. From microspores to rape plants. A tentative way to low glucosinolate strains. In: Sorensen H. (ed.): *Advance in the Production and Utilisation of Cruciferous Crops*. Martinus Dordecht, Boston, Lancaster, Nijhoff M, Junk W. Publishers. - 1985. - P. 268–277.
4. Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species // *Plant Breed.* - 1989. - Vol. 103. - P. 119–123.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* - 1962. - Vol. 15 (3). - P. 473-497.
6. Supena E.D.J., Winarto B., Riksen T., Dubas E., Lammeren A., Offringa R., Boutilier K., Custers J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning // *J Exp Bot.* - 2008. - Vol. 59 (4). - P. 803–814.
7. Swanson E.B. Microspore Culture in Brassica. in: JW Pollard and JM Walker (Eds) *Methods in Molecular Biology // Plant Cell and Tissue Culture.* - 1990. - Vol. 6. - Chap. 17.
8. Telmer C.A., Simmonds D.H. & Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus* // *Physiol. Plant.* - 1992. - Vol. 84. - P. 417-424.
9. Zorinants S., Tashpulatov A.S., Heberle-Bors E., Touraev A. The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis // Springer, Heidelberg. - 2005. - P. 35–52.
10. Yeung E.C., Rahman M.H. & Thorpe T.A. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas. I. Histodifferentiation // *Intl. J. Plant Sci.* - 1996. - Vol. 157. - P. 27-39.

Рецензенты:

Равин Н.В., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории систем молекулярного клонирования, заместитель директора Центра «Биоинженерия» РАН, г. Москва.

Коротков Е.В., д.б.н., руководитель группы компьютерного анализа последовательностей ДНК и белков Центра «Биоинженерия» РАН, г. Москва.