

*На правах рукописи*

**КОТЛЯРОВА Оксана Валерьевна**

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ  
ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ ДЛЯ  
СОЗДАНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ  
МОРКОВИ (*Daucus carota* L.)**

Специальность: 06.01.05. - селекция и семеноводство  
сельскохозяйственных растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Государственном научном учреждении  
Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства  
Россельхозакадемии в 2002-2009 гг.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Поляков  
Алексей Васильевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор

**Леунов  
Владимир Иванович**  
ГНУ ВНИИО  
Россельхозакадемии

доктор биологических наук,  
доцент

**Соловьев  
Александр Александрович**  
РГАУ-МСХА  
им. К.А. Тимирязева

**Ведущая организация:** ГНЦ ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова

Защита диссертации состоится «10» ноября 2010 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 006.022.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте овощеводства Россельхозакадемии по адресу: 140153 Московская обл., Раменский район, д. Верея, строение 500, ВНИИО.

Факс (49646) 2-43-64

E-mail: [vniioh@yandex.ru](mailto:vniioh@yandex.ru), [www.vniioh.ru](http://www.vniioh.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института овощеводства.

Автореферат разослан – «    » октября 2010 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Л.Н. Прянишникова

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Для создания высокоурожайных, выровненных по комплексу признаков гибридов  $F_1$  моркови, разных сроков созревания, необходим новый линейный материал. На создание стерильных и фертильных линий традиционным способом необходимо потратить не один десяток лет. Поэтому перед селекционерами стоит задача изучить и разработать эффективные способы получения гомозиготного материала.

Одним из перспективных направлений биотехнологии является получение и использование гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Использование методов индуцированного апомиксиса, андро- и гиногенеза позволяет в относительно короткие сроки получать генетически константные растения, которые представляют большой интерес для получения родительских линий и использования их в гетерозисной селекции (Поляков А.В., 2000; Пролетова Н.В., Поляков А.В., Лошакова Н.И., Каранова С.Л., 2003; 2004). Другие методы получения гаплоидов менее изучены и их практическое использование в селекции носит ограниченный характер.

Морковь – является модельным объектом в биотехнологических исследованиях и многие методы регенерации растений из различных тканей и органов хорошо разработаны (Тюкавин Г.Б., 2007; Калашникова Е.А., и др., 2006). Однако ряд вопросов, связанных с получением растений-регенерантов из репродуктивных органов, остаётся недостаточно изученным для практического использования в селекционном процессе.

### **Цель и задачи исследований.**

Целью данной работы являлось – усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Уточить способы идентификации гаплоидов моркови;
2. Изучить полиэмбрионию для получения гаплоидов моркови;
3. Получить семена моркови при индуцированном апомиксисе;
4. Усовершенствовать элементы технологии получения удвоенных гаплоидов моркови в эмбриокультуре;
5. Усовершенствовать элементы технологии получения андро – и гиногенных растений моркови;
6. Сравнить методы получения растений-регенерантов для создания удвоенных гаплоидов (полиэмбриония, метод гаплоиндукции, андрогенез, и гиногенез) и выявить наиболее эффективный для использования в селекционном процессе.

**Объект исследований** – методы получения удвоенных гаплоидов моркови культура пыльников, семяночек, индуцированный апомиксис, эмбриокультура, полиэмбриония.

**Предмет исследований** – пыльники, семяночки, зародыши, семена линий, сортов и гибридов  $F_1$  моркови столовой (*Daucus carota* L.).

**Научная новизна работы.** В результате проведенных исследований усовершенствованы элементы технологии получения регенерантов из репродуктивных органов для создания удвоенных гаплоидов моркови.

Показано, что у гаплоидов число замыкающих клеток устьиц в поле зрения микроскопа при увеличении 15х40 составляет 14-16 шт., у диплоидов - 9-12 шт., число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидов - 6-9 шт., у диплоидов - 12-14 шт.

Впервые показано, что частота появления полиэмбриональных семян у моркови зависит от сортообразца и колеблется от 0 до 0,25%, а частота появления близнецовых гаплоидов от 0 до 0,05%.

Опыление цветков моркови, характеризующихся петалоидным типом стерильности, пылью сельдерея сорта Белоснежный и петрушки сорта Алба на фоне обработки растений *a*-НУК в концентрации 0,075 г/л и гиббереллина в концентрации 0,025 г/л приводит к образованию апомиктичных семян, всхожесть которых варьирует от 9% до 21%, что позволяет получить до 0,15% жизнеспособных апомиктичных растений.

Показано, что культивирование апомиктичных зародышей *in vitro* позволяет получить жизнеспособные растения, которые составляют от 0,5% до 2,3% от числа культивируемых зародышей.

Культивирование семяпочек на среде MSm, включающей полный состав питательных веществ и 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л, позволяет получить от 1,6% до 6,7% эмбрионных образований.

**Практическая ценность исследований.** Проведено сравнение эффективности способов получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови: андрогенез, гиногенез, эмбриокультура. Определены условия культивирования от введения эксплантов *in vitro* до укоренения побегов и адаптации растений-регенерантов к условиям *in vivo*.

Установлена частота образования близнецовых гаплоидов моркови, которая составляет от 0 до 0,05%.

Выявлено, что линия 8В характеризуется высокой андрогенной, сорт *Manufurujı long* – гиногенной способностью, у которых частота образования эмбрионидов соответственно составляет 18,9% и 43,5%.

Установлено, что использование среды MS, содержащей половинную дозу макро- и микроэлементов, ИМК в концентрации 0,5 мг/л, сахарозу - 10 г/л и агар - 7 г/л в зависимости от типа экспланта позволяет укоренить от 79,8% до 77,5% побегов.

**Обоснование и достоверность научных положений.** Исследования выполнены по методикам, рекомендованным научными учреждениями страны. Все выводы и предложения подтверждены экспериментальными исследованиями, статистической обработкой полученных данных.

**Апробация работы.** Основные результаты экспериментальной работы по диссертации, выводы и предложения были доложены или представлены на Международной научно-практической конференции «Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в

XXI веке» (Москва, 2003г.), Международной научно – практической конференции «Биотехнология овощных, цветочных и малораспространенных культур» (Москва, 2004 г.), III Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005), III Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создание функциональных продуктов» (Москва, 2005 г.), а также на заседаниях методической комиссии селекции, семеноводству и биотехнологии ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии (2002-2009 гг.)

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- полиэмбриония у моркови как источник получения гаплоидов;
- уточнённые условия получения апомиктических семян;
- оптимизированные условия получения апомиктических растений моркови в эмбриокультуре;
- уточнённые условия культуры пыльников моркови;
- уточнённые условия культуры семян почеч моркови.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов, заключения, предложений для использования в селекционной практике, списка использованной литературы содержащего 181 наименование, в том числе 91 иностранных авторов. Изложена диссертация на 165 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц, иллюстрирована 23 рисунками и 5 приложениями.

#### **2. УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследования проведены в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИО), расположенном в Раменском районе, Московской области в период 2002 – 2009 гг.

Исследования проводили на 16 сортообразцах моркови, полученных из отдела селекции. В качестве гаплоиндуктора использовали сорта и гибриды сельдерея и петрушки, полученные из отдела семеноводства ГНУ ВНИИО.

Полевые опыты проводили в соответствии с Методикой опытного дела в овощеводстве и бахчеводстве (под ред. Белика В.Ф., 1992).

Исследования в условиях *in vitro* проводили в соответствии с Методическими указаниями по культуре ткани и органов в селекции растений (Бутенко Р. Г., Хромова Л. М., Седнина Г.А., 1984; Поляков А.В., 2005).

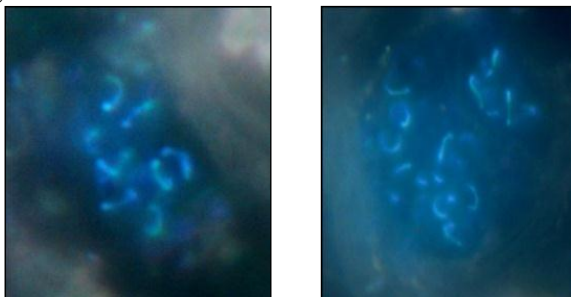
Изучение содержания сухого вещества, витамина С, сахаров в потомствах растений-регенерантов проводили по методике И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна, (1998).

Цитологический анализ растений-регенерантов проводили по методике В.А. Пухальского, А.А. Соловьёва, Е.Д. Бадаева и др. (2004).

Математическую обработку экспериментальных данных проводили на основе методов математической статистики по методикам, опубликованным у Б.А. Доспехова (1979).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Идентификация гаплоидов моркови.** Цитологический метод идентификации гаплоидов сложен и трудоемок, поэтому для облегчения работы применяют косвенные методы, позволяющие из большей по численности группы растений выделить немногочисленную группу предполагаемых гаплоидов, и тем самым, сократить количество образцов, подвергаемых цитологическому анализу.



а

б

Рисунок 1 –а – гаплоидный ( $n=9$ ), б - диплоидный набор хромосом ( $2n=18$ ) растений моркови столовой линии 1238 В, полученных методом полиэмбрионии.

Проведенные нами цитологические исследования показали, что у гаплоидных растений число хромосом равно 9, число устьиц составляет - 14-16 шт., хлоропластов - 6-9 шт., а у диплоидов число хромосом равно 18 шт., устьиц - 9-12 шт., хлоропластов 12-14 шт. в замыкающих клетках устьиц в поле зрения микроскопа при увеличении 15х40 (рис. 1, табл. 1).

Таблица 1 - Цито – анатомическая характеристика гаплоидов и диплоидов моркови (*Daucus carota* L.).

Признаки	Гаплоиды	Диплоиды
Число хромосом, шт.	9	18
Число устьиц в поле зрения микроскопа (15 x 40), шт.	14-16	9-12
Число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, шт.	6-9	12-14
Стерильность пыльцы, %	100	0,2-8,0



а



б

Рисунок 2 - Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц линии 1238 В: а – гаплоид (8 шт.), б – диплоид (13 шт.)

#### **Полиэмбриония у моркови как источник получения гаплоидов.**

Анализ первоисточников не выявил информации полиэмбрионии у моркови. В связи с этим нами изучено 15 образцов этого вида культурного растения-моркови и установлено, что образование полиэмбриональных семян в значительной степени обусловлено их генотипом. Наибольшее число близнецовых проростков обнаружено у линии REW (0,26 %) и образца Ранний цилиндрический 2 (0,25 %).

Проведённый цито – анатомический анализ близнецов позволил выявить среди близнецовых пар 18 гаплоидов, что в среднем составило 0,05%. Наибольшая частота образования близнецовых гаплоидов была у линии REW, которая составила 0,17% (табл. 2).

Таблица 2 - Частота встречаемости полиэмбрионии у моркови  
(*Daucus carota* L.) 2004 - 2005 гг.

Сорт, линия, гибрид F <sub>1</sub>	Изуче- но про- рост- ков, шт.	Обнаружено пар близнецов, всего		в т.ч. близнецо- вых гаплоидов	
		шт.	%±Sp	шт.	%±Sp
Леандр	4055	2	0,05±0,035	0	0
НИИОХ 336	2280	1	0,04±0,04	0	0
Витаминная 6	1467	0	0	0	0
Лосиноостровская 13	1910	0	0	0	0
Нюанс	823	1	0,12±0,12	0	0
1238 П	3148	2	0,06±0,04	0	0
1238 В	4795	8	0,17±0,06	5	0,10±0,05
8В	2395	3	0,13±0,07	1	0,04±0,04
1268 С	1758	2	0,11±0,08	0	0
1268 В	1806	2	0,11±0,08	0	0
Crookham company	783	0	0	0	0
REW	2334	6	0,26±0,11	4	0,17±0,09
Ранний круглый 1	1154	2	0,17±0,12	1	0,09±0,09
Ранний цилиндрический 2	1574	4	0,25±0,13	2	0,13±0,09
Топаз F <sub>1</sub>	5056	10	0,20±0,06	5	0,10±0,04

Исследования показали, что частота образования близнецовых гаплоидных растений с учетом их выживаемости составляла от 0 (линия 8В и образцы Ранний круглый 1, Ранний цилиндрический 2) до 0,06% (F<sub>1</sub>Топаз).

**Индукцированный апомиксис.** В наших опытах при обработке растений регуляторами роста и опылении растений стерильных линий моркови пыльцой сельдерея и петрушки наблюдалось образование апомиктических семян. Наибольшее количество таких семян завязывалось при опылении пыльцой сельдерея сорта Белоснежный и пыльцой петрушки сорта Алба в сочетании с обработкой материнских растений а-НУК в концентрации 0,075г/л совместно с гиббереллином в концентрации 0,025г/л (табл.3).



Таблица 3 -Характеристика семян моркови, полученных при индуцированном апомиксисе (2002-2005 гг.)

Показатель	Варианты опыта					
	контроль	а-НУК+гибереллин	опыление пылью сельдерея сорта Белоснежный	опыление пылью сельдерея сорта Белоснежный +а-НУК+гибереллин	опыление пылью петрушки сорта Алба	опыление пылью петрушки сорта Алба + а-НУК+гибереллин
Линия 1238 П						
Число опыленных цветков, шт.	87300	89100	89950	87700	86500	87300
Получено семян, шт.	0	3128	2778	3317	527	1330
Завязываемость семян, %	0	3,5	3,1	3,8	0,6	1,5
Масса семян, г	0	0,77	0,91	1,11	0,09	0,29
Масса 1000 семян, г	0	0,25	0,33	0,33	0,17	0,22
Линия 1585 П						
Число опыленных цветков, шт.	84200	83750	84670	83160	84580	83930
Получено семян, шт.	0	440	115	1080	35	1270
Завязываемость семян, %	0	0,5	0,1	1,3	0,04	1,5
Масса семян, г	0	0,55	0,12	1,04	0,08	1,69
Масса 1000 семян, г	0	1,25	1,04	0,96	1,29	1,33

### Получение апомиктических растений моркови в эмбриокультуре.

Использование эмбриокультуры для получения растений-регенерантов моркови *in vitro* может быть альтернативным способом сохранения слабожизнеспособных, в том числе гаплоидных зародышей.

Для изучения эффективности эмбриокультуры *in vitro* вводили 10, 20, 30, 40, 50 суточные апомиктические зародыши, полученные от опыления стерильных линий моркови 1238 П и Г-67 пылью сельдерея сорта Белоснежный. Проведенные нами исследования показали, что наибольшее количество (от 3% до 6,7%) прорастающих апомиктических зародышей было получено при культивировании 50 суточных зародышей (табл. 4).

Таблица 4 - Влияние возраста зародышей на образование жизнеспособных апомиктов моркови (среда MSm, содержащая 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л, 2006-2007 гг.)

Линия	Возраст зародышей, сутки	Число культивируемых зародышей, шт.	Образовалось жизнеспособных зародышей		Образовалось растущих зародышей	
			шт.	% $\pm$ Sp	шт.	% $\pm$ Sp
1238 П	10	52	10	19,2 $\pm$ 5,5	0	0
	20	79	24	30,4 $\pm$ 5,2	0	0
	30	90	30	33,3 $\pm$ 5,0	0	0
	40	30	11	30,0 $\pm$ 8,4	1	3,3 $\pm$ 3,3
	50	30	13	43,3 $\pm$ 9,0	2	6,7 $\pm$ 4,6
Г – 67	10	50	9	18,0 $\pm$ 5,4	0	0
	20	77	24	31,2 $\pm$ 5,3	0	0
	30	90	30	33,3 $\pm$ 5,0	0	0
	40	28	10	35,7 $\pm$ 9,0	0	0
	50	32	10	31,3 $\pm$ 8,2	1	3,1 $\pm$ 3,0

Известно, что успешное культивирование незрелых семян и зародышей растений во многом зависит от состава питательной среды. В работе мы использовали среды, широко применяемые для культуры незрелых зародышей растений: MSm (Masuda K., Kikuta Y., 1981), Norstog (Norstog K., 1973), Monnier (Monnier M., 1978) и Gamborg B<sub>5</sub> (Gamborg O.L., 1984).

Проведенные исследования показали, что наибольшее количество прорастающих зародышей образовывалось на среде MSm и составляло от 26,0% до 35,0% (табл. 5).

Таблица 5 – Эффективность культивирования апомиктических зародышей на питательных средах, содержащих 2,4-Д в концентрации-0,2 мг/л (2006-2007 гг.)

Линия	Среда	Число культивируемых эксплантов, шт.	Число растущих эксплантов	
			шт.	% $\pm$ Sp
1238 П	MSm	38	10	26,3 $\pm$ 7,1
	Norstog	42	7	16,7 $\pm$ 5,8
	Monnier	40	7	20,0 $\pm$ 6,3
	Gamborg	42	5	11,9 $\pm$ 5,0
Г - 67	MSm	36	11	30,6 $\pm$ 7,7
	Norstog	42	10	23,8 $\pm$ 6,6
	Monnier	36	8	22,2 $\pm$ 7,0
	Gamborg	44	11	25,0 $\pm$ 6,5
1585 П	MSm	20	7	35,0 $\pm$ 10,7
	Norstog	22	6	27,3 $\pm$ 9,5
	Monnier	20	6	30,0 $\pm$ 10,2
	Gamborg	24	4	16,6 $\pm$ 7,6

При культивировании апомиктических зародышей моркови *in vitro* немаловажное значение имеет подбор регуляторов роста и их концентрации. В своей работе мы изучали влияние 2,4-Д, 2ip и тидиазурона в различных концентрациях. Проведенные исследования показали, что наибольшее количество растущих апомиктических зародышей получено в вариантах при использовании 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л и составляло от 11,0% до 23,0%.

Проведенные исследования показали, что использование эмбриокультуры позволяет получить в зависимости от образца жизнеспособные растения от 0,48% (линия 1238 П) до 2,26% (линия 1585 П) (табл. 6).

Таблица 6 – Эффективность получения растений-регенерантов в эмбриокультуре (2006-2007 гг.)

Линия	Проанализировано незрелых зародышей, шт.	Получено регенерантов		Выжило растений		Образовалось жизнеспособных апомиктов, %
		шт.	%	шт.	%	
1238 П	825	19	2,3	7	36,8	0,85
Г-67	827	15	1,8	4	26,7	0,48
1585 П	266	22	8,3	6	27,3	2,26

**Получение регенерантов в культуре пыльников и семяпочек.** Ряд авторов отмечает положительный эффект действия различных биологически активных веществ и физических факторов на эффективность культуры пыльников (Тураев А., и др. 1996; Поляков А.В., 2000).

В наших опытах с целью повышения пролиферирующей способности пыльников и семяпочек использовали трёхкратную обработку донорных растений с интервалом в трое суток регуляторами роста: цитодеф в концентрации 0,2 мл/л, эмистим- 0,0001 мл/л, гиббереллин – 0,025 г/л и *α*-НУК – 0,075 г/л (табл. 7).

Таблица 7- Влияние регуляторов роста на эмбриогенез моркови в культуре пыльников и семян (2003-2005 гг.)

Сорт, линия	Регулятор роста	Концентрация	Изучено, шт.		Получено эмбрионных, %±Sp	
			пыльников	семян-почек	пыльников	семян-почек
Лосиноостровская 13	контроль	-	1573	747	0,9±0,2	22,2±1,5
	цитодиф	0,2 мл/л	580	242	5,5±0,9	39,7±3,1
	эмистим	0,0001 мл/л	1204	698	0	13,8±1,3
	а-НУК + гиббереллин	0,075 мг/л 0,025мг/л	1119	643	1,5±0,4	11,5±1,3
Нюанс	контроль	-	1608	765	0,9±0,2	25,8±1,6
	цитодиф	0,2 мл/л	709	802	7,0±0,9	45,1±1,8
	эмистим	0,0001 мл/л	1412	338	3,9±0,5	18,9±4,5
	а-НУК + гиббереллин	0,075 мг/л 0,025мг/л	951	678	0	12,5±1,3
Monufuruji long	контроль	-	978	544	0,6±0,2	28,1±1,9
	цитодиф	0,2 мл/л	485	251	6,4±1,1	25,1±2,7
	эмистим	0,0001 мл/л	396	243	4,3±1,0	21,4±2,6
	а-НУК + гиббереллин	0,075 мг/л 0,025мг/л	401	205	0	22,9±2,9
8В	контроль	-	1428	810	0,9±0,2	22,5±1,5
	цитодиф	0,2 мл/л	495	248	4,2±0,9	21,8±2,6
	эмистим	0,0001 мл/л	946	681	0	19,8±1,5
	а-НУК+ гиббереллин	0,075 мг/л 0,025мг/л	826	576	0	28,6±1,9

Отмечено, что наилучшие результаты получены при обработке донорных растений цитодифом. Эмбрионные экспланты при использовании этого вещества составляли от 4,0% до 7,0% в культуре пыльников и от 23,0% до 45,0% в культуре семян.

Наиболее высоким эмбрионным потенциалом в культуре пыльников характеризовалась линия 8В (19,0%), в культуре семян - сорт Manufuruji long (44,0%) (табл.8).

Таблица 8 – Эффективность каллусо- и эмбриогенеза моркови в культуре пыльников и семян (2002-2004 гг.)

Сорт, линия	Число культивируемых, шт.		Получено новообразований, %±Sp			
			эмбриогенных		каллусогенных	
	пыль-ников	семя-почек	пыль-ников	семя-почек	пыль-ников	семя-почек
Лосиноостровская 13	287	97	3,5±1,1	0	14,6±2,1	0
Нюанс	305	104	3,0±1,0	18,3±3,8	1,3±0,7	1,9±1,3
НИИИОХ 336	297	107	0	0	0	0
Manufuruji long	325	85	2,8±0,9	43,5±5,4	1,5±0,7	3,5±2,0
8В	317	48	18,9±2,2	8,3±1,4	2,2±0,8	0
1268 В	219	83	0	0	0	0

Как отмечалось ранее, одним из важных факторов *in vitro* технологий является состав питательной среды и концентрация ее компонентов.

В наших опытах отмечено, что культивирование пыльников и семян на среде MSm, концентрация которой была снижена на 25%, 50% и 75% сопровождалось снижением морфогенетической активности. Наиболее эффективной была среда MSm, содержащая полный состав макро- и микроэлементов, позволившая получить от 4,0% до 6,0% эмбриогенных пыльников и от 2,0% (сорт Нюанс) до 7,0% (линия 8В) эмбриогенных семян.

Температурный стресс может применяться в качестве стимулирующего фактора для повышения эффективности каллусо- и эмбриогенеза. При использовании метода андрогенеза *in vitro* используют предобработку как низкой положительной температурой (Dunwell J.M., 1985; Муромовцев Г.С. и др., 1990), так и высокой (Bajaj Y.P.S., 1983).

Исследования, проведенные Г.Б. Тюкавиным (2007) по культивированию изолированных пыльников моркови при низкой и высокой температуре, эффекта не дали. Но при этом отмечено, что холодовая предобработка соцветий способствовала активизации каллусо- и эмбриогенеза в культуре пыльников.

В наших опытах изучено влияние пониженной температуры (+5°C) на эмбриогенную активность моркови при воздействии ею в течение 12, 24, 36 и 48 часов.

Таблица 9 - Влияние пониженной температуры (+5<sup>0</sup>С) на эмбриогенную активность пыльников и семяпочек (2003-2005 гг.)

Сорт, линия	Продолжительность воздействия	Число культивируемых, шт.		Получено эмбриогенных, % $\pm$ Sp	
		пыль-ников	семя-почек	пыль-ников	семя-почек
Лосино-островская 13	контроль*	310	372	6,1 $\pm$ 1,4	10,8 $\pm$ 1,6
	12	267	236	5,2 $\pm$ 1,4	11,9 $\pm$ 2,1
	24	235	206	4,3 $\pm$ 1,3	7,3 $\pm$ 1,2
	36	258	208	4,7 $\pm$ 1,3	0
	48	320	-	8,1 $\pm$ 1,5	-
Нюанс	контроль*	292	401	9,2 $\pm$ 1,7	8,0 $\pm$ 1,4
	12	305	336	8,2 $\pm$ 1,6	11,6 $\pm$ 1,7
	24	287	306	5,9 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 0,9
	36	426	294	0	6,1 $\pm$ 1,4
	48	328	-	13,1 $\pm$ 1,9	-
Monufuruji long	контроль*	503	244	8,7 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 1,8
	12	433	215	8,3 $\pm$ 1,3	10,2 $\pm$ 2,0
	24	328	190	7,3 $\pm$ 1,4	8,4 $\pm$ 2,0
	36	492	178	5,3 $\pm$ 1,0	0
	48	342	-	10,8 $\pm$ 1,7	-
8В	контроль*	541	283	5,2 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,9
	12	308	151	4,5 $\pm$ 1,2	4,0 $\pm$ 1,6
	24	253	136	0	0
	36	226	110	0	0
	48	327	-	9,8 $\pm$ 1,6	-

Примечание: \*контроль - культивирование пыльников при температуре 25<sup>0</sup>С.

У сорта Нюанс и линии 8В отмечено увеличение частоты образования эмбриогенных пыльников от 8,0% до 13,0% при воздействии пониженной температурой в течение 48 часов.

В культуре семяпочек у сорта Нюанс получены положительные результаты при воздействии пониженной температурой в течение 12 часов. Частота образования эмбриогенных семяпочек в этом варианте составила 11,6% (табл. 9). У других сортообразцов существенное влияние пониженной температуры на пыльники и семяпочки не отмечено.

**Укоренение.** Для укоренения побегов часто используют безгормональные агаризованные питательные среды, у которых содержание макро- и микроэлементов снижено в два раза, а концентрация сахарозы составляет 1% (Полякова А.В., 2000, 2007, 2010). Эти условия способствуют хорошей укореняемости и интенсивному развитию корневой системы растений-регенерантов.

Наши исследования показали, что наибольшее количество укоренившихся побегов в культуре пыльников (79,8)% и семяпочек (77,5)% на среде, где содержание макро- и микроэлементов было снижено в два раза ( $1/2$  MS), содержание индолилмасляной кислоты (ИМК) составляло 0,5 мг/л, сахарозы - 10 г/л (табл. 100).

Применение индолилмасляной кислоты (ИМК) в концентрации 1,0 мг/л приводило к образованию каллуса на основаниях побегов и витрификации растений – регенерантов.

Таблица 10- Укоренение побегов моркови на среде  $1/2$  MS

Концентрация ИМК в среде, мг/л	Число укореняемых побегов, шт.		Укоренилось побегов			
			шт.		%±Sp	
	пыль-ников	семя-почек	пыль-ников	семя-почек	пыль-ников	семя-почек
0 (контроль)	117	120	49	40	41,9±4,6	33,3±4,3
0,1	95	106	47	45	49,5±5,1	42,4±4,8
0,25	102	91	67	57	65,6±4,7	62,6±5,1
0,5	84	71	62	55	79,8±5,3	77,5±4,9
1,0	90	98	59	68	65,5±5,0	69,4±4,7

Проведенные исследования по культивированию пыльников и семяпочек, а затем образовавшихся на их основе эмбриоидов, почек и побегов позволили получить растения-регенеранты, которые с использованием влажной камеры были адаптированы к обычным условиям (рис. 2). Лучше всего прошли адаптацию растения-регенеранты сорта *Manufuruji long*, полученные в культуре пыльников, и сорта Ньюанс, полученные в культуре семяпочек, их доля составила по 94,0%.

В течение вегетации часть растений погибла и к уборке из регенерантов, полученных в культуре пыльников, выжило от 50 % (линия 8В) до 79% (сорт Ньюанс), а в культуре семяпочек - от 53% (сорт *Manufuruji long*) до 73% (сорт Ньюанс) (табл. 11).



Таблица 11 - Адаптация растений-регенерантов

Сорт, линия	Изучено растений- регенерантов, шт.		Число адаптирован- ных <i>in vivo</i> растений %±Sp		Число выживших <i>in vivo</i> растений %±Sp	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*
Нюанс	85	97	92,9±2,8	93,8±2,4	78,8±4,4	73,1±4,5
Manufuruji long	32	229	93,8±4,3	72,9±2,9	65,6±8,4	52,8±3,3
8В	285	74	88,4±1,9	82,4±4,4	49,5±3,0	63,5±5,6

Примечание: \*1 – культура пыльников; \*2 – культура семян.



Рисунок 2 - Растения-регенеранты моркови, полученные в культуре пыльников

Анализ результатов показал, что количество жизнеспособных растений-регенерантов в пересчете от числа введенных в культуру эксплантов в зависимости от образца, составило в культуре пыльников от 0,3% (Manufuruji long) до 1,7% (линия 8В), а в культуре семян - от 0,87% (линия 8В) до 3,65% (Manufuruji long) (табл.12, 13).

Таблица 12 - Эффективность получения растений-регенерантов моркови в культуре пыльников

Сорт, линия	Проанализировано пыльников, шт.	Получено растений		Выжило растений		Образовалось жизнеспособных растений от числа культивируемых пыльников, %
		шт.	%	шт.	%	
Нюанс	8962	85	0,95	67	78,8	0,8
Manufuruji long	6151	32	0,52	21	65,6	0,3
8В	8087	285	3,52	141	49,5	1,7

Таблица 13 - Эффективность получения растений-регенерантов моркови в культуре семян

Сорт, линия	Проанализировано семян, шт.	Получено растений		Выжило растений		Образовалось жизнеспособных растений от числа культивируемых семян, %
		шт.	%	шт.	%	
Нюанс	6104	97	1,59	71	73,2	1,2
Manufuruji long	3313	229	6,91	121	52,8	3,65
8В	5378	74	1,38	47	63,5	0,87

Проведённый цитологический анализ растений-регенерантов, полученных при индуцированном апомиксисе, эмбриокультуре, а также в культуре пыльников и семян показал, что все они являются удвоенными гаплоидами (табл. 14).

Таблица 14 - Цитологический анализ растений

Вариант	Получено регенерантов, шт.	Проанализировано регенерантов всего, шт.	Обнаружено			
			удвоенных гаплоидов		гаплоидов	
			шт.	% $\pm$ Sp	шт.	% $\pm$ Sp
Индукцированный апомиксис	337	64	18	19,0 $\pm$ 2,1	0	0
Эмбриокультура	17	15	15	88,2 $\pm$ 7,8	0	0
Культура пыльников	229	77	77	33,6 $\pm$ 3,1	0	0
Культура семяпочек	239	82	82	34,3 $\pm$ 3,1	0	0

Сравнительный анализ эффективности способов получения удвоенных гаплоидов моркови показал, что культура семяпочек является наиболее перспективной для использования в селекционном процессе. В зависимости от условий культивирования и сортообразца этот метод позволяет получать удвоенные гаплоиды с частотой 0,9-3,7% при минимальном риске появления мутаций (табл.15).

Таблица 15– Эффективность методов получения удвоенных гаплоидов моркови

Способ получения	Частота образования	
	гаплоидов	удвоенных гаплоидов
Полиэмбриония	0 - 0,06	0
Индукцированный апомиксис	0	0 - 0,15
Эмбриокультура	0	0,48 - 2,26
Культура пыльников	0	0,34 - 1,74
Культура семяпочек	0	0,87 - 3,65

В литературных источниках мало встречается данных об изменении морфологических признаков полученных удвоенных гаплоидов по сравнению с исходным образцом. В некоторых источниках отмечено, что удвоенные гаплоиды не уступают, а иногда и превосходят исходные формы по хозяйственно ценным признакам (Поляков А.В., 2000).

Морфологический анализ показал, что ряд потомств растений-регенерантов, полученных различными способами и в результате самоопыления, характеризовалось большей выравненностью по сравнению с исходными образцами (табл. 16).

Таблица 16 - Характеристика линий первого поколения R<sub>1</sub> по морфологическим признакам

Линия	Изуче- но рас- тений, шт.	Окраска кор- неплода, %		Поверхность корнеплода, %		Форма корнеплода, %		Форма головки корнеплода, %		Размер головки корнеплода, %	
1	2	3		4		5		6		7	
Индукцированный апомиксис											
1238 П (кон- троль)	14	оранж.	100	гладкая неровная	79* 21*	конич. уд.конич.	79* 21*	округлая сл.вогнут.	86* 14*	маленькая средняя	57* 43*
R <sub>26</sub>	14	оранж. жел.-ор.	93* 7*	гладкая неровная	93* 7*	конич. уд.конич.	79* 21*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	50* 50*
R <sub>28</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	конич. уд.конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
1585 П (кон- троль)	15	оранж.	100	гладкая неровная	87* 13*	конич. уд.конич. цилиндр.	80* 7* 13*	округлая сл.вогнут. вогнутая	80* 7* 13*	маленькая средняя	60* 40*
R <sub>14</sub>	15	оранж. жел.-ор.	93* 7*	гладкая неровная	93* 7*	конич. уд.конич. цилиндр.	79* 7* 13*	округлая сл.вогнут. вогнутая.	87* 13* 0	маленькая средняя	53* 47*
R <sub>17</sub>	15	оранж.	100	гладкая неровная	87* 13*	конич. уд.конич. цилиндр.	87* 0 13*	округлая сл.вогнут. вогнутая	80* 7* 13*	маленькая средняя	60* 40*
Культура пыльников											
Нюанс (кон- троль)	12	оранж.	100	гладкая неровная	83* 17*	цилиндр. конич.	83* 17*	округлая сл.вогнут.	92* 8*	маленькая средняя	58* 42*
R <sub>8</sub>	12	оранж.	100	гладкая неровная	92* 8*	цилиндр. конич.	92* 8*	округлая сл.вогнут.	83* 17*	маленькая средняя	50* 50*

Продолжение таблицы 17

1	2	3		4		5		6		7	
R <sub>12</sub>	12	оранж.	100	гладкая неровная	83* 17*	цилиндр. конич.	83* 17*	округлая сл.вогнут.	92* 8*	маленькая средняя	58* 42*
8 В (кон- троль)	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
R <sub>26</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	50* 50*
R <sub>29</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
Культура семян											
Нюанс (кон- троль)	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	86* 14*	маленькая средняя	64* 36*
R <sub>14</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
R <sub>24</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
8 В (кон- троль)	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	64* 36*
R <sub>28</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	50* 50*
R <sub>37</sub>	14	оранж.	100	гладкая неровная	86* 14*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	64* 36*

\*Примечание: доля корнеплодов, характеризующихся данными признаками.

Проведенный химический анализ корнеплодов показал, что потомство растения-регенеранта номера 90 линии 1238 П, полученного при индуцированном апомиксисе и 105 линии 8В, полученного в культуре пыльников, выделились по содержанию каротиноидов и сухого вещества. Эти показатели были выше, чем у исходных форм на 14,7% и 10,9% по каротиноидам и на 2,4% и 2,2% по сухому веществу (табл. 17).

Таблица 17 –Содержание каротиноидов и сухого вещества в корнеплодах R<sub>1</sub> (n=12)

Сорт, линия	Содержание каротиноидов, мг/%		Содержание сухого вещества, %	
	размах варьирования	Х ср.	размах варьирования	Х ср.
Линия 1238 В, контроль	12,0...16,6	14,3	10,7...12,7	11,7
1238 П - 90 + пыльца сельдерея сорта Белоснежный	24,0...34,0	29,0	12,2...16,0	14,1
1238 П - 99+гиббереллин 0,025 г/л, НУК– 0,075 г/л	11,5...20,3	15,9	10,4...12,2	11,3
Лосиноостровская 13, контроль	18,0...22,5	20,2	9,1...11,5	10,3
Лосиноостровская 13 - 101 (культура семяпочек)	14,5...20,0	17,3	9,8...12,5	12,5
Лосиноостровская 13 - 103 (культура семяпочек)	11,5...18,0	14,7	9,4...14,0	11,7
Линия 8В, контроль	9,0...16,8	12,9	9,7...11,1	10,4
8В - 105 (культура пыльников)	17,0...30,4	23,8	10,2...14,8	12,5
8В - 107 (культура пыльников)	12,5...20,5	16,5	8,1...10,7	9,4

При этом потомство регенеранта 90 линии 1238 П, полученного методом индуцированного апомиксиса, на 1,5% превышало исходную форму по содержанию аскорбиновой кислоты и дисахаров (табл. 18). Потомств регенерантов, превосходящих исходные формы по содержанию глюкозы, выявлено не было.

Таблица 18 - Содержание углеводов и аскорбиновой кислоты в корнеплодах R<sub>1</sub> (n=12)

Вариант	Аскорбиновая кислота, мг/%	Дисахара, %	Глюкоза, г/100 г
Линия 1238 В (контроль)	2,0	2,5	1,3
1238 П - 90 + пыльца сельдерея Белоснежный.	3,4	4,0	1,0
1238 П- 99+ гиббереллин 0,025 г/л, НУК – 0,075г/л.	1,3	3,2	1,3
Лосиноостровская 13 (контроль)	2,4	3,6	0,7
Лосиноостровская 13 101 (культура семяпочек)	2,7	3,7	0,5
Лосиноостровская 13 103 (культура семяпочек)	1,9	3,4	1,0
Линия 8В (контроль)	3,4	1,0	1,1
8В - 105 (культура пыльников)	4,1	2,9	0,2
8В - 107 (культура пыльников)	2,8	3,7	0,6

## ВЫВОДЫ

1. Из изученных способов получения удвоенных гаплоидов моркови (культура пыльников, семяпочек, эмбриокультура, апомиксис) наиболее эффективным является культура семяпочек. В зависимости от условий культивирования и образца он позволяет получать удвоенные гаплоиды с частотой 0,9-3,7%.

2. Полиэмбриония у моркови может служить источником получения гаплоидов, частота образования которых в зависимости от образца составляет от 0 до 0,17%, а с учётом их выживаемости от 0 до 0,06%. Наибольшая частота полиэмбриональных гаплоидов обнаружена у линий REW и F<sub>1</sub> Топаз.

3. Опыление цветков моркови пыльцой сельдерея сорта Белоснежный и петрушки сорта Алба на фоне обработки растений раствором а-НУК в концентрации 0,075 г/л и гиббереллина - 0,025 г/л сопровождается формированием апомиктических семян. Всхожесть семян варьирует от 9% до 21%, что позволяет получить до 0,15% жизнеспособных апомиктических растений. Наиболее отзывчивой является линия Г- 67.

4. Оптимизированы условия, влияющие на выход апомиктических растений моркови в эмбриокультуре:

- оптимальный возраст введения зародышей в культуру *in vitro* составляет 50 суток;

- культивирование зародышей на среде MSm в зависимости от линии позволяет получить от 26,3% до 35,0% растущих эксплантов;
- метод эмбриокультуры позволяет получить апомиктические жизнеспособные растения от 0,5% (линия 1238 П) до 2,3% (линия 1585 П).

5. Уточнены условия, влияющие на выход растений - регенерантов в культуре пыльников:

- обработка донорных растений регуляторами роста позволяет получить от 4,2% до 9,9% эмбриогенных и от 6,5% до 41,2% каллусогенных эксплантов в зависимости от сорта;
- выявлены образцы, характеризующиеся различной андрогенетической способностью. Наиболее высоким эмбриогенным потенциалом характеризуется линия 8В, у которой частота образования эмбриогенных эксплантов составляет 19,0%.
- культивирование пыльников на среде MSm, включающей полный состав питательных веществ, 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л, 2 ip – 2 мг/л позволяет получать до 4,5% эмбриогенных эксплантов;
- укоренение побегов на среде MS, содержащей половинную концентрацию макро- и микроэлементов, ИМК в концентрации 0,5 мг/л, сахарозу - 10 г/л и агар - 7 г/л позволяет получать до 79,8% укоренившихся побегов. Выживаемость растений *in vivo* в зависимости от образца составляет 49,5% - 78,8%;
- метод культуры пыльников в зависимости от образца позволяет получить от 0,34% (Manufuruji long) до 1,74% (линия 8В) жизнеспособных растений-регенерантов.

6. Оптимизированы условия, влияющие на выход растений-регенерантов моркови в культуре семян:

- обработка донорных растений регуляторами роста позволяет получить от 11,5% до 45,1% эмбриогенных эксплантов в зависимости от образца и варианта обработки;
- выделены образцы, характеризующиеся различной гиногенной способностью. Наиболее высоким эмбриогенным потенциалом характеризуется линия 8В (8,3%) и сорт Manufuruji long (43,5 %);
- культивирование семян на среде MSm, включающей полный состав питательных веществ, 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л позволяет получить от 1,6% до 6,7% эмбриогенных образований;
- укоренение побегов моркови на среде MS, содержание макро- и микроэлементов в которой снижено в два раза, ИМК в концентрации 0,5 мг/л, сахарозу -10 г/л и агар - 7 г/л позволяет получать 77,5% укоренившихся побегов. Выживаемость растений-регенерантов в условиях *in vivo* составляет от 52,8% до 73,1% в зависимости от образца.



### Предложения для использования в селекционной практике

1. Для получения растений-регенерантов в культуре семяночек:
  - проводить обработку донорных растений раствором цитодефа в концентрации 0,2 мг/л;
  - семяночки культивировать на среде MSm, включающей полный состав питательных веществ и 2,4-Д в концентрации 0,2 мг/л;
  - укоренение побегов осуществлять на питательной среде MS, где содержание макро- и микроэлементов снижено в два раза, концентрация ИМК составляет 0,5 мг/л, сахарозы - 10 г/л, агар - 7 г/л.
2. Идентификацию гаплоидных растений (n=9) следует проводить по числу устьиц (12-14 шт. в поле зрения микроскопа при увеличении 15x40) на нижней стороне листа и количеству хлоропластов (6-9 шт.) в замыкающих клетках устьиц.

### Список опубликованных работ по теме диссертации

По результатам исследований по теме диссертации опубликовано 6 работ, в т.ч. одна в журнале «Картофель и овощи», рекомендованном ВАК РФ.

1. Ильченко О.В. Оценка генотипов моркови различного географического происхождения на устойчивость к фузариозу и альтернариозу в условиях искусственного инфекционного фона / Т.Н. Лебедева, Н.В. Ипатова, А.В. Поляков, О.В. Ильченко//Материалы Всероссийского совещания: «Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и генной инженерии», 16-18 июля 2003 г. М.: ВНИИФ, 2003.- С. 61 – 63.

2. Ильченко О.В. Андро- и гиногенез моркови (*Daucus carota* L.) /А.В. Поляков, О.В. Ильченко // Международная научно-практическая конференция «Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в XXI веке», Москва, 2003. – С. 420-422.

Ichenko O.V. Andro- and gynogenesis of carrot (*Daucus carota* L.) / A.V. Poliakov, O.V. Ichenko // «International scientific – practical conference «Perspective directions in breeding and seed production of agricultural plants in XXI century» Moscow, 2003. – P. 420-422.

3. Ichenko O.V. Production of andro- and gynogenic plants of carrot (*Daucus carota* L.) / A.V. Poliakov, O.V. Ichenko //Proceedings of International Scientific Practical Conference “Biotechnology of vegetable, flower and not widely spread crops” (March, 22 – 25, 2004). – Moscow: Institute of Vegetable crops, 2004. – P. 146 – 150.

4. Ильченко О.В. Получение регенерантов сельдерейных (Apiaceae), тыквенных (Cucurbitaceae), капустных (Brassicaceae) и ряда цветочных культур *in vitro* / А.В. Поляков, И.И. Тарасенков, О.И. Федоришина, А.А. Ткачева,

Н.Н., О.В. Ильченко, Ананьина, Н.Н. Лебедева, М.И. Иванова, Т.В. Ларионова, И.Н. Боровикова //III Московскиймеждународный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. - Москва (14 - 18 марта 2005 г.), 2005. - С. 286-287.

Ilchenko O.V. Obtaining regenerants of Apiaceae, Cucurbitaceae, Brassicaceae and some flower crops *in vitro* / A.V. Poliakov, I.I. Tarasenkov, O.I. Fedorishyna, A.A. Tkacheva, O.V. Ilchenko, N.N. Ananina, N.N. Lebedeva, M.I. Ivanova, T.V. Larionova, I.N. Borovikova //III Moscow International Congress “Biotechnology: state of the art and prospects of development”.- Moscow (March, 14 – 18, 2005), 2005. - P. 286-287.

5. Ильченко О.В. Распространение полиэмбрионии у моркови (*Daucus carota* L.) / А.В. Поляков, Т.Э. Клыгина, О.В. Ильченко //III Российская научно-практическая конференция “Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов”. - Москва: РАЕН, (6 – 7 июня 2005 г.), 2005.- С. 40 – 41.

6. Ильченко О.В. Получение апомиктических семян моркови. /О.В. Ильченко //Картофель и овощи. – 2007. - №6. – С.31.