

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, 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 15x40 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 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).

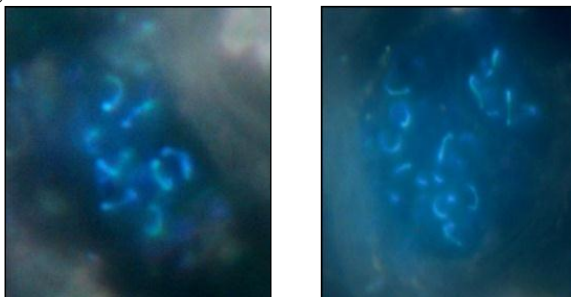
Изучение содержания сухого вещества, витамина С, сахаров в потомствах растений-регенерантов проводили по методике И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна, (1998).

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 ₁	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 ₁	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% (F₁Топаз).

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 B₅ (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
Monufurujj 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 Manufurujj 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 (+5⁰С) 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 25⁰С.

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
8B	285	74	88,4±1,9	82,4±4,4	49,5±3,0	63,5±5,6

Примечание: *1 – культура пыльников; *2 – культура семяночек.



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 8B), а в культуре семяночек - от 0,87% (линия 8B) 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 R₁ 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 ₂₆	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 ₂₈	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 ₁₄	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 ₁₇	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 ₈	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 ₁₂	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 ₂₆	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	86* 14*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	50* 50*
R ₂₉	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 ₁₄	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	57* 43*
R ₂₄	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 ₂₈	14	оранж.	100	гладкая неровная	93* 7*	цилиндр. конич.	93* 7*	округлая сл.вогнут.	93* 7*	маленькая средняя	50* 50*
R ₃₇	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 R₁ (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 R₁ (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 F₁ 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 мл/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.