

*На правах рукописи*

ЧИСТОВА Анастасия Викторовна

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ *IN VITRO* ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ F<sub>1</sub> ГИБРИДОВ  
МОРКОВИ НА ОСНОВЕ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство  
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва - 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» на кафедре селекции и семеноводства садовых культур в 2011-2014 гг.

**Научный руководитель:** **Монахос Сократ Григорьевич**  
кандидат сельскохозяйственных наук,  
доцент кафедры селекции и семеноводства  
садовых культур ФГБОУ ВО «Российский  
государственный аграрный университет -  
МСХА имени К.А. Тимирязева»

**Официальные оппоненты:** **Шмыкова Наталья Анатольевна**  
доктор сельскохозяйственных наук,  
заведующая лабораторией биотехнологии  
ГНУ ВНИИССОК Россельхозакадемии

**Бутов Илья Станиславович**  
кандидат сельскохозяйственных наук,  
редактор-журналист журнала «Картофель и  
овощи»

**Ведущая организация:** ФГОУ ВПО "Российский государственный  
аграрный заочный университет"

Защита диссертации состоится «\_\_» марта 2015 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.022.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте овощеводства по адресу: 140153 Московская обл., Раменский район, д. Веря, строение 500, ВНИИО

Факс (496) 462-43-64

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

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

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Девочкина Наталья  
Леонидовна

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Морковь (*Daucus carota* L., var. *sativus* Hoffmn.) является важнейшей овощной культурой, широко возделываемой по всему миру. По данным FAOSTAT, Российская Федерация является одним из лидеров по производству моркови и репы (FAOSTAT statistics database, <http://faostat3.fao.org>), при этом важнейшей проблемой остается селекция и производство семян отечественных F<sub>1</sub> гибридов (Леунов В.И., 2011; Пивоваров В.Ф., 2012).

Гибридное семеноводство моркови ведут с использованием ядерно-цитоплазматической мужской стерильности по достаточно трудоемкой генетико-селекционной трехлинейной схеме, согласно которой создают мужски стерильную материнскую линию, ее фертильный аналог (закрепитель стерильности) и отцовскую линию (по возможности также закрепитель стерильности), при этом существует проблема нестабильного проявления стерильности (Жидкова Н.И., 1996) и, как следствие, высокого процента примеси в гибридных семенах.

Альтернативные схемы селекции и производства гибридных семян до настоящего времени не использовали, однако интеграция оптимизированных биотехнологических методов (создание линий – удвоенных гаплоидов и микрклональное размножение родительских линий) в селекционные схемы позволит получать F<sub>1</sub> гибриды моркови на новой для этой культуры биологической основе - самонесовместимости. При использовании самонесовместимых линий моркови станет возможным применять менее сложные двух-, трех- и четырехлинейные схемы.

**Цель и задачи.** Целью данной работы является оптимизация технологий получения и микрклонального размножения линий - удвоенных гаплоидов при интеграции их в генетико-селекционную схему создания F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости.

Достижение цели предполагает решение следующих задач:

1) оптимизировать технологию получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных пыльников: определить ключевые морфологические параметры цветковых бутонов, соответствующие определенной стадии развития микроспор; изучить влияние температурной обработки на эффективность эмбрио- и каллусогенеза; выявить оптимальный состав питательной среды для получения эмбриоидов и каллуса из пыльников; изучить возможность использования культуры изолированных микроспор в производстве удвоенных гаплоидов моркови; оптимизировать методы определения плоидности и гомозиготности растений-регенерантов.

2) оптимизировать технологию микрклонального размножения для репродукции самонесовместимых родительских линий моркови: изучить возможность введения в культуру в зависимости от этапа онтогенеза донорного растения; изучить эффективности размножения - эмбриогенеза

и регенерации в каллусной и суспензионной культуре клеток; определить хронологический регламент изоляции эксплантов и введения в культуру для интеграции технологии в селекционно-семеноводческую схему.

3) Разработать генетико-селекционную схему создания F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости.

**Научная новизна.** Показана высокая степень проявления самонесовместимости линий, завязываемость 0,4 семян/соцветие при самоопылении и 138,9 семян/соцветие при перекрестном опылении.

Установлено, что на питательной среде В5 с 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 500 мг/л гидролизата казеина, 0,1 мг/л 2,4-D и 0,1 мг/л НАА при культивировании пыльников эмбриониды и каллус могут быть получены у 42,5% высаженных пыльников.

Температурная обработка введенных в культуру пыльников моркови +32°C в течение 2 суток повышает способность пыльников формировать эмбриониды и каллус до 5,8-88,3% в зависимости от генотипа и состава питательной среды.

Показано проявление самонесовместимости у растений моркови и предложена схема производства гибридных семян на ее основе.

**Практическая значимость.** Разработана генетико-селекционная схема создания F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости с интегрированными биотехнологическими методами создания линий – удвоенных гаплоидов и микроклонального размножения родительских линий.

Оптимизированная технология культуры пыльников моркови позволяет получать до 103,3 растений-регенерантов со ста высаженных пыльников.

Установлен оптимальный для репродукции родительских линий моркови метод микроклонального размножения и срок их введения в культуру.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

- Строгое проявление самонесовместимости у растений моркови позволяет использовать данное явление в гибридном семеноводстве и является основой для разработки генетико-селекционной схемы производства F<sub>1</sub> гибридов моркови, включающей интеграцию методов получения и размножения линий - удвоенных гаплоидов.
- При производстве удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников оптимизированный состав питательной среды (В5 с 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 500 мг/л гидролизата казеина, 0,1 мг/л 2,4-D и 0,1 мг/л НАА) обеспечивает до 42,5% пыльников, формирующих эмбриониды и каллус.
- Инкубирование введенных в культуру пыльников моркови при температуре +32°C в течение 48 часов в темноте повышает эффективность андрогенеза в культуре пыльников в среднем в 2,6 раза.

- Основные элементы интегрированной в генетико-селекционную схему технологии микрклонального размножения: тип экспланта – любая доступная живая неинфицированная ткань, сроки введения в культуру – конец декабря, метод культуры – суспензионная культура клеток.

**Апробация результатов.** Результаты исследований доложены и обсуждены на 5 конференциях: Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная созданию объединенного аграрного вуза в Москве (Москва, 2014 г.); Международная научная конференция, посвященная 150-летию академика В.Р. Вильямса (Москва, 2013 г.); Научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 170-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2013г.); XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2013 г.); Научная конференции молодых ученых и специалистов, посвященная 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Москва, 2012 г.).

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 129 страницах компьютерного текста, содержит 21 таблицу, 20 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов, выводов, рекомендаций производству, приложений. Библиографический список включает 125 источников, в том числе 88 на иностранных языках.

## II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Растительный материал.

В качестве растительного материала для культуры пыльников и микроспор использовали свободноопыляемые сорта Тайфун и Соната, F<sub>1</sub> гибриды Навал, Маэстро и Болеро, а также инбредные линии и селекционные образцы из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева»: растения семьи 8М-08р, линии третьего поколения инбридинга Кантербюри1-411, Кантербюри14-21, Кантербюри1-421, линии-закрепители стерильности Зс1-2, Зс1, Зс1СО, Зс4, Зс1-1 и Зс4-31, линию 152р3, растения гибридной комбинации Зс11×Навал2. Растения выращивали по общепринятой методике с соблюдением агротехнических мероприятий для получения семенников в условиях открытого или защищенного грунта.

### 2.2. Оценка проявления самонесовместимости

Для изучения проявления самонесовместимости использовали растения, полученные в результате микрклонального размножения

линий закрепителей стерильности Зс1-1 и Зс4-31. В отапливаемой теплице было высажено пять растений – клонов линии Зс1-1 и семь растений - клонов линии Зс4-31, прошедших яровизацию.

Соцветия центральной оси, первого и второго порядков до распускания цветков помещали в бумажные изоляторы по 2-5 соцветий одного растения в один изолятор. Во время цветения изоляторы снимали и на трех соцветиях каждого растения осуществляли самоопыление, опыление пылью другой линии и опыление пылью растения сорта Тайфун.

Для изучения наследования самонесовместимости, проводили скрещивание растения самонесовместимой инбредной линии Зс1-1 с растением самосовместимого F<sub>1</sub> гибрида Навал. Оценку проявления самонесовместимости проводили на шести растениях F<sub>1</sub> гибридного потомства. Для этого их самоопыляли под изолятором и учитывали завязываемость семян.

### 2.3. Культура пыльников

Культивировали пыльники, содержащие микроспоры в стадии развития от тетрад до поздней одноядерной. Цитологический анализ осуществляли с использованием красителей DAPI и ацетокармина (Пухальский В.А. с соавт., 2007).

После поверхностной стерилизации бутонов, пыльники извлекали и помещали на твердую питательную среду в пластиковые чашки Петри по 35-45 шт. (табл. 1).

Таблица 1.

Состав питательных сред для культивирования пыльников

Компоненты питательной среды	КП 1	КП2	КП 3	КП 4	КП 5	КП 6	КП 7	КП 8
Базовая питательная среда	B5	B5	MSm	NLN	NLN	B5	B5	B5
L-Glutamine, г/л	0,5	-	-	0,8	0,8	0,5	0,5	0,5
L-Serine, г/л	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Гидролизат казеина, г/л	-	-	0,5	-	-	-	0,5	0,5
2,4-D, мг/л	0,1	1	0,2	-	-	0,1	0,1	0,1
НАА, мг/л	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1
Сахароза, г/л	100	20	20	130	200	20	20	100
Агар, г/л	6,5							

Пыльники растений сорта Тайфун культивировали на питательных средах, рекомендованных Goreska K. с соавт., 2009г. (КП1), Hu K.L. с соавт., 1993г. (КП2), Тюкавиным Б.Г., 2010г. (КП3), а также на средах КП4 и КП5.

Пыльники растений Кантербюри, F<sub>1</sub> Навал, 8М-08р, 3с1-2 и 3с1 культивировали на питательных средах, рекомендованных Gorecka K. с соавт., 2009г. (КП1), Hu K.L. с соавт., 1993г. (КП2), Тюкавиным Б.Г., 2010г. (КП3), а также на средах КП6, КП7, КП8.

#### 2.4. Культура микроспор

Изолированные микроспоры растений сортов Тайфун и Соната, семьи 8М08р, линий Кантербюри, 152р3, F<sub>1</sub> гибридов Навал, Маэстро, Болеро культивировали на питательных средах, рекомендованных Gorecka K. с соавт. (2010) (КМ1), Custers J.V.M. (2003) для культуры микроспор рапса (КМ2), на среде КМ3. Изолированные микроспоры растений линий 3с1-2, 3с1, 3с1СО и 3с11хНавал2 культивировали на питательной среде, рекомендованной Li J.-R. et al., 2013 (КМ4) (табл. 2).

Таблица 2.

Состав питательных сред для выделения и культивирования микроспор

Компоненты питательной среды	Выделение микроспор	Культивирование микроспор			
	ВМ	КМ1	КМ2	КМ3	КМ4
Базовая питательная среда	В5	В5	NLN	NLN	NLN
L-Glutamine, г/л	-	0,5	0,8	0,8	0,5
L-Serine, г/л	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Манитол	50	50	50	50	50
2,4-D, мг/л	-	0,1	-	-	0,1
НАА, мг/л	-	0,1	-	-	0,1
Сахароза, г/л	130	100	130	90	130

Сравнивали два варианта температурной обработки введенных в культуру пыльников и изолированных микроспор двух генотипов: +32°C в течение суток и +5°C в течение 2 суток.

Полученные эмбриониды и каллус культивировали на среде В5 без регуляторов роста (Gorecka K. с соавт., 2009), сформировавшиеся растения адаптировали к нестерильным условиям теплицы.

#### 2.5. Оценка ploидности и гомозиготности

Анализ ploидности полученных в культуре пыльников растений осуществляли по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и прямым подсчетом хромосом меристематических клеток кончиков корней. Препараты готовили методом раздавленной капли с использованием 1% раствора AgNO<sub>3</sub> и методом распластывания клеток с использованием красителя Гимза (Пухальский В.А. с соавт., 2007).

Для оценки гомозиготности полученных в культуре пыльников растений проводили молекулярно-генетический анализ.

## 2.6. Микрклональное размножение

Микрклональное размножение самонесовместимых линий осуществляли методами культуры тканей и суспензионной культуры клеток с использованием общепринятых методик и питательных сред, представленных в таблицах 3 и 4.

В качестве эксплантов использовали у линии Зс4 корнеплод после зимнего хранения, у линий Зс1-2 и Зс1 - стебли, листья и черешки листьев во время цветения в условиях защищенного грунта.

Таблица 3.

Состав питательных сред для микрклонального размножения моркови в каллусной культуре

Компоненты питательной среды	Среды для каллусогенеза			Среды для регенерации				
	К1	К2	К3	Р1	Р2	Р3	Р4	Р5
Базовая питательная среда	MS	MS	MS	B5	B5	B5	B5	B5
2,4-D, мг/л	0,2	1,0	2,0	-	-	-	0,1	-
NAA, мг/л	-	-	-	0,1	-	-	0,1	-
6-BAР, мг/л	-	-	-	-	0,2	-	-	-
Кинетин, мг/л	-	-	-	-	-	0,1	-	-
Сахароза, г/л	20							
Агар, г/л	6,5							

Таблица 4.

Состав питательных сред для микрклонального размножения моркови в суспензионной культуре клеток

Компоненты питательной среды	Среды для получения и культивирования культуры клеток		Среды для эмбриогенеза в культуре клеток	
	СК1	СК2	СЭ1	СЭ2
Базовая питательная среда	MS	MS	MS	MS
2,4-D, мг/л	0,1	1	-	-
Абсцизовая кислота, мг/л	-	-	0,1	-
Сахароза, г/л	20	20	20	20

Эксперименты закладывали в 2-3 повторностях, по 1 чашке Петри (диаметр 6 см или 9 см) или колбе Эрленмейера (250 мл) в повторности.

## 2.7. Статистическая обработка

Для статистической обработки полученных экспериментальных данных применяли двухфакторный дисперсионный анализ (Доспехов Б.А., 1985) с использованием персонального компьютера и программы Microsoft Exel 2010.



### III. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Завязываемость семян при самоопылении

В результате самоопыления под изоляторами завязываемость семян линии Зс1-1 составила 0 семян/соцветие, линии Зс4-31 – 0,9 семян/соцветие (до 4 семян). В результате перекрестного опыления Зс1-1×Зс4-31 получено 0,6 семян/соцветие, Зс4-31×Зс1-1 – 0,7 семян/соцветие, Зс1-1×Тайфун – 416 и Зс4-31×Тайфун – 421,4 семян/соцветие. Строгое проявление самонесовместимости у моркови, делает возможным ее использование в производстве F<sub>1</sub> гибридных семян.

#### 3.2. Анализ наследования самонесовместимости

В результате опыления самонесовместимого растения линии Зс1-1 самосовместимым растением F<sub>1</sub> гибрида Навал получены семена. Из шести растений F<sub>1</sub> гибридного потомства три были самосовместимыми и три растения – самонесовместимыми. Это позволяет предположить, что растение линии Зс1-1 было гомозиготным по аллелям самонесовместимости, а самосовместимое растение растением F<sub>1</sub> гибрида – гетерозиготным, то есть ген самосовместимости доминирует над аллелями гена самонесовместимости.

#### 3.3. Культура пыльников

Эмбрио- и каллусогенез в культуре пыльников были отмечены невооруженным глазом через 2-5 месяцев культивирования и продолжались в течение 2-3 месяцев. Наблюдали три типа развития: эмбриогенез (единичные эмбриоиды или их группы от 2-5 до нескольких десятков штук), одновременное образование каллуса и эмбриоидов, либо образование только каллуса (рис. 1).

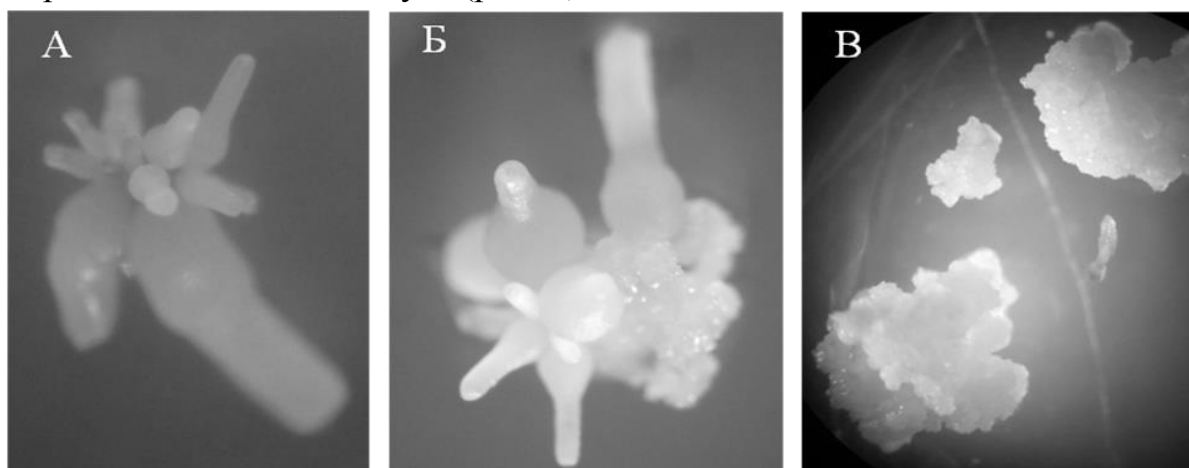


Рис. 1. Эмбрио- и каллусогенез в культуре пыльников моркови: А - Эмбриогенез в культуре пыльников растения Кантербюри 1-411 на среде КП7; Б – Каллусо- и эмбриогенез в культуре пыльников Навал 2 на среде КП3; В – Каллусогенез в культуре пыльников растения Зс1-2 на среде КП3

### 3.4. Влияние генотипа и состава питательной среды на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников

Выявлено достоверное влияние генотипа, питательной среды и взаимодействия этих двух факторов на эффективность культуры пыльников. Процент формирующих эмбриониды и каллус пыльников составил от 0 до 42,5%. Лучшие результаты были получены при использовании генотипов Кантербюри 1-411, Зс1-2, Навал 2 и 8М-08р 77 (табл. 5).

Таблица 5.

Среднее число формирующих эмбриониды и каллус пыльников растений моркови в зависимости от варианта питательной среды, шт.

Генотип (А)	Питательная среда (В)						
	КП1	КП2	КП3	КП6	КП7	КП8	Средние
Кантербюри 1-411	4,3	1,3	9,7	0,0	10,0	3,3	4,8
Кантербюри 14-21	0	0	0	0	2,3	1,0	0,6
Кантербюри 1-421	0	0	0	0	1,7	2,3	0,7
F <sub>1</sub> Навал 2	3,0	0,7	8,7	0,0	17,0	0	4,9
F <sub>1</sub> Навал 1	0	0	0	0	0,0	0	0,0
152р3	0	0	0	0	0	0	0,0
Зс12	2,7	0,0	16,7	2,7	3,3	0	4,2
Зс 1	0	0	0	0	12,7	0	2,1
8М-08р 6-1	2,0	0	0	0	0	0	0,5
8М-08р 77	1,7	10,3	3,3	1,3	0	1,0	4,4
8М-08р 24-1	0,3	0,0	0,7	0,0	0	0	0,3
8М-08р 54	0,3	0	0	0	0	0	0,1
8М-08р 32	0	0	0	0	0	0	0,0
8М-08р 28	0	0	0	0	0	0	0,0
8М-08р 26	0	0	0	0	0	0	0,0
8М-08р 45	0	0	0	0	0	0	0,0
Средние	1,1	0,9	3,0	0,3	3,6	0,6	1,6

НСР05А (генотип донорного растения) – 2,63; НСР05В (состав питательной среды) – 1,61; НСР05АВ (взаимодействия двух факторов) – 6,45; цветом отмечены лучшие варианты опыта.

В среднем для всех исследованных генотипов достоверно лучшими оказалась среды КП3 и КП7 (табл.6). Однако для генотипа 8М-08 6-1 единственно успешным оказалось культивирование на среде КП1, а большая часть растений от генотипа 8М-08 77 регенерировала из эмбрионидов, полученных на среде КП2, которая в других случаях не проявила эффективности. Высокая доля влияния взаимодействия факторов (48%) указывает на то, что при работе с новыми генотипами следует использовать несколько вариантов питательных сред.

Таблица 6.

Влияние состава питательной среды на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников

Состав питательной среды	Кол-во высаженных пыльников, шт.	Кол-во формирующихся эмбриониды и/или каллус пыльников, шт.	Процент формирующихся эмбриониды и/или каллус пыльников	Кол-во полученных растений, шт.	Кол-во растительных соотавляющих пыльников, шт.
КП1	1560	43	2,8	89	5,7
КП2	1560	37	2,4	26	1,7
КП3	1560	117	7,5	177	11,3
КП6	1560	12	0,8	18	1,2
КП7	1560	141	9,0	186	11,9
КП8	1560	23	1,5	21	1,3
НСР05	-	1,61	-	-	-

### 3.5. Влияние температурной обработки на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников

В эксперименте по изучению влияния температурной обработки введённых в культуру пыльников использовали растения двух генотипов – Кантербюри 1-411 и Навал 2.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал наличие влияния температурной обработки и питательной среды на эффективность культуры пыльников у обоих генотипов. Доля влияния температурной обработки составила 42% в культуре пыльников Кантербюри 1-411 и 45% в культуре пыльников Навал 2.

Влияние температурной обработки было идентичным для двух генотипов (рис.2). Высокотемпературная обработка +32°C в течение 2 суток вызвала положительный эффект, особенно при культивировании на средах КП3 и КП7, процент формирующих эмбриониды и каллус пыльников в зависимости от варианта составил 5,8 - 88,3%. Инкубирование в течение 2 суток при температуре +5°C негативно повлияло на индукцию эмбрио- и каллусогенеза, процент формирующих эмбриониды и каллус пыльников не превышал 1%.

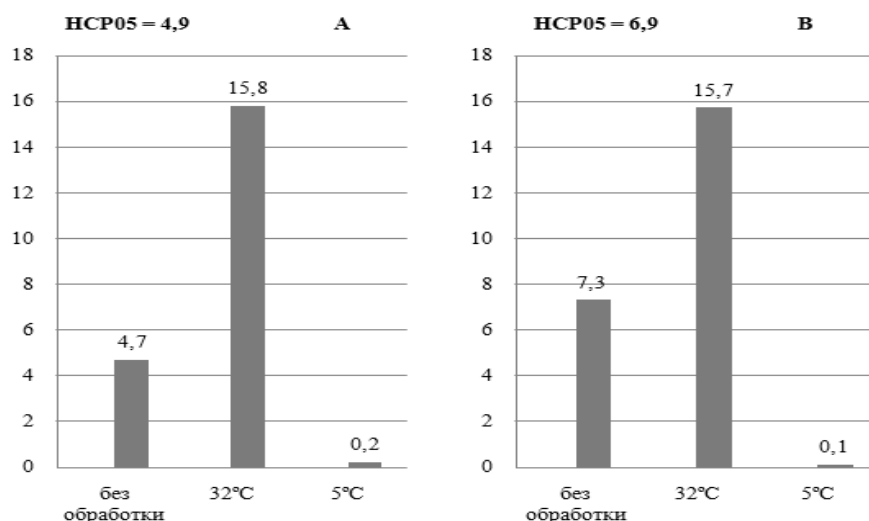


Рис. 2. Среднее число пыльников, формирующих эмбриониды и каллус после температурной обработки, шт.: А – Кантербюри 1-411; Б – Навал 2.

### 3.6. Анализ гомозиготности

Для выявления гомозиготных растений подбирали кодоминантные молекулярно-генетические маркеры. В работе использовали 28 пар праймеров микросателлитных (SSR) маркеров моркови (Cavagnaro P. et al., 2011). В результате проведения SSR-ПЦР один из маркеров показал 2 амплифицированных фрагмента у материнского генотипа Тайфун 2 и полиморфизм среди растений, полученных в культуре пыльников этого растения (рис. 3), что позволяет выявить гетерозиготные клоны материнского растения, и образцы, показывающие один амплифицированный фрагмент – гаплоидные или гомозиготные растения. Среди 89 регенерантов обнаружено 64 гомозиготных растений (72%).

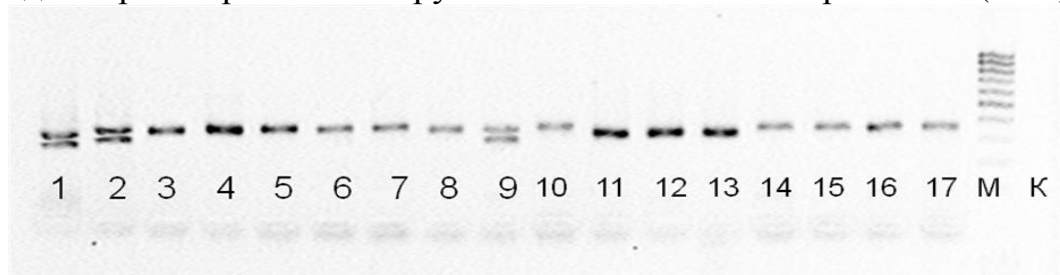


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации с маркером GSSR-9: 1 – материнское растение; 2 ...17 – растения, полученные в культуре пыльников; М – маркер длины ДНК-фрагмента; К – отрицательный контроль (вода).

### 3.7. Культура микроспор

Изолированные микроспоры образцов 3с11СО и 3с11хНавал2 культивировали на среде КМ4, 2 суток после изолирования инкубировали в темноте при температуре +32°C, затем в темноте в условиях климатической камеры. Через 1 месяц культивирования было отмечено

формирование веретеновидных многоклеточных структур, видимых при увеличении 20х, через 3 месяца культивирования наблюдали эмбриогенез (рис.4).

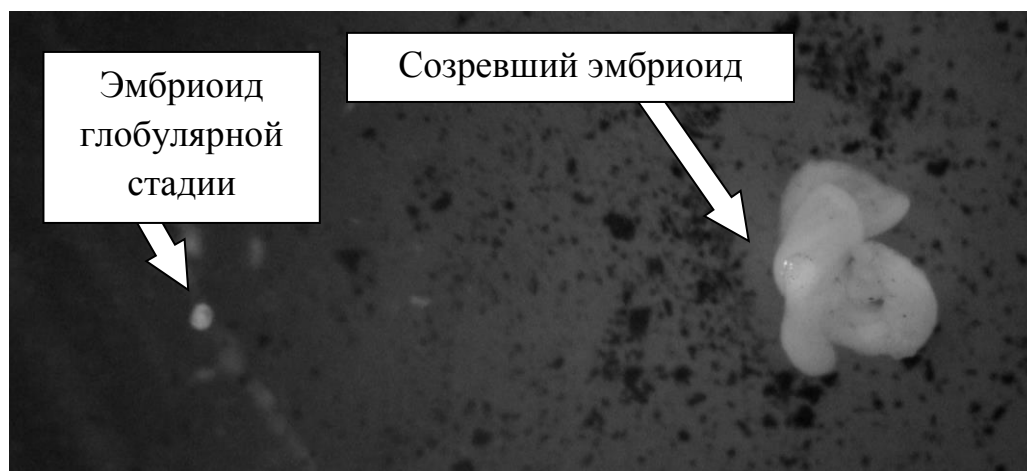


Рис. 4. Эмбриогенез в культуре микроспор 3с11СО через 3 месяца культивирования на питательной среде КМ4

Зрелый эмбрионид (рис. 4) в процессе культивирования при постоянном покачивании на шейкере и бытовом освещении сформировал вторичные эмбриониды, после пересадки на твердую питательную среду Р5 (табл. 3) в течение 2 недель часть из них проросли.

Единичный успех при культивировании микроспор указывает на необходимость продолжать работу по оптимизации технологии.

### **3.8. Микрклональное размножение**

Образование каллуса тканями корнеплода, стеблей, листьев, черешков листьев проходило на всех вариантах питательных сред К1, К2, К3 (табл. 3). Отмечено качественное морфологическое различие формируемого каллуса: на среде К1 образовался бесструктурный бежево-серый каллус, на средах К2 и К3 – плотный или рыхлый зеленовато-бежевый каллус.

### **3.9. Каллусная культура**

В каллусной культуре эмбриогенез происходил только при использовании каллуса, полученного на среде К3.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал статистически достоверное различие вариантов опыта, влияние регенерационной питательной среды, генотипа донорного растения и взаимодействия двух этих факторов на эмбриогенез и формирование регенерантов.

Наиболее эффективным из представленных вариантов размножения моркови в каллусной культуре является получение эмбриогенного каллуса культивированием эксплантов на среде К3 с последующими эмбриогенезом и регенерацией на среде Р5 (до 15,3 растений на чашку

Петри, содержащую около 0,2 г каллусной массы ). Однако в каллусной культуре статистически достоверным оказалось также влияние генотипа, поэтому на практике следует учитывать и этот факт.

### 3.10. Суспензионная культура клеток

В суспензионной культуре клеток образование хорошо развитых эмбриоидов происходило из каллусов, полученных на всех трех вариантах сред (К1, К2, К3). Эмбриоиды формировались как в жидких средах для эмбриогенеза СЭ1 и СЭ2 через 2-4 недели культивирования, так и в средах для получения клеточной суспензии СК1 и СК2 при продолжительном культивировании без пересадки в течение 4-6 недель (табл. 4).

Варьирование выхода сеянцев при применении суспензионной культуры клеток составило в среднем по вариантам от 0 до 216,7 шт. на колбу, в среднем получено 52,7 проростков с 1 колбы. Наиболее результативным вариантом опыта является подготовка каллуса на среде К2 и К3 с последующим культивированием в жидкой среде СК1 и индукцией эмбриогенеза на СЭ2 (рис. 5).

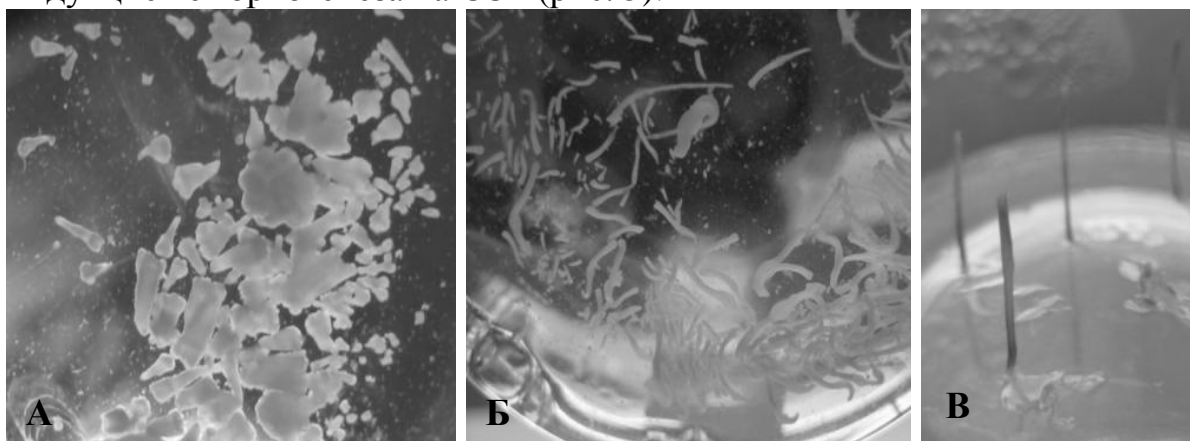


Рис. 5. Этапы микроклонального размножения моркови в суспензионной культуре клеток: А - Эмбриоиды в жидкой среде СЭ2 через 3 недели культивирования. Б - Эмбриоиды в жидкой среде СЭ2 через 4 недели культивирования. В - Проростки, полученные на жидкой среде СЭ2, через 4 дня культивирования на твердой среде Р5

Статистическая обработка данных суспензионной культуры клеток выявила отсутствие существенного влияния генотипа на выход регенерантов, что при подтверждении этих данных в других исследованиях с другими генотипами позволит использовать выявленный лучший вариант как универсальный для микроклонального размножения моркови. Кроме того этот метод позволяет получать неограниченное количество клонов, что дает возможность отбирать хорошо развитые проростки для гарантированной адаптации и быстрого роста и обеспечения массового размножения родительских линий.

### 3.11. Схема селекции F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости с интеграцией методов культуры тканей и клеток

Разработанная генетико-селекционная схема производства F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости с интегрированными биотехнологиями создания линий – удвоенных гаплоидов и клонального микроразмножения представлена в таблице 7.

Таблица 7.

Схема производства F<sub>1</sub> гибридов моркови на основе самонесовместимости с интегрированными биотехнологиями создания линий – удвоенных гаплоидов и клонального микроразмножения

Год	Выполняемые операции
<b>1 год.</b>	а) Поиск в популяциях исходного материала растений со строгим проявлением самонесовместимости и их использование в качестве доноров для производства линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ).
	б) Производство линий - удвоенных гаплоидов в культуре пыльников или микроспор.
<b>2-3 год.</b>	а) Оценка проявления самонесовместимости и комбинационной способности ЛУГ в системе топ-красса.
	б) Проведение гибридологического анализа и разделение ЛУГ по аллелям локуса самонесовместимости;
	в) Введение ЛУГ в культуру тканей для сохранения и последующего размножения – создание банка клонов линий.
<b>4 год.</b>	а) Проведение стационарного испытания и передача перспективных гибридных комбинаций для государственного сортоиспытания.
	б) Поддержание родительских ЛУГ в культуре тканей.
<b>5-6 год.</b>	а) Госсортоиспытание
	б) Промышленное семеноводство F <sub>1</sub> гибридных семян.

Использование данной схемы позволяет сократить продолжительность селекционного процесса до 6 лет за счет устранения этапа получения изогенной пары.

При больших объемах производства гибридных семян семеноводство предложено вести по четырехлинейной схеме (рис. 6).

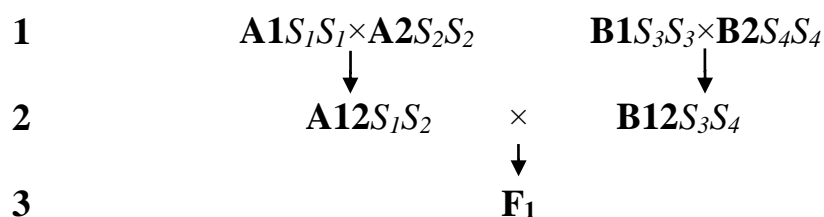


Рис. 6. Четырехлинейная схема производства семян  $F_1$  гибридов моркови на основе самонесовместимости

При четырехлинейной схеме подбор линий для создания пар  $A1$  и  $A2$ ,  $B1$  и  $B2$  осуществляется по принципу наибольшего морфологического сходства. Среди ЛУГ-потомства, полученного от одного гетерозиготного по  $S$ - аллелям растения сортовой популяции. Исходные пары линий поддерживают и размножают микроклонально, а переопылением линий одной пары получают семена промежуточных гибридов-родительских линий  $F_1$  гибридов. Поддержание исходных пар линий и получение семян родительских линий осуществляют в учреждении-оригинаторе. Для производства 1 кг семян родительских линий достаточно 100 растений исходной пары линий, которые легко размножить микроклонально. Семена взаимно совместимых родительских линий - гетерозигот по разным парам  $S$ -аллелей высевают в зоне промышленного семеноводства (субтропики) и получают семена  $F_1$  гибридов. Для успешного семеноводства необходимы исследования по разработке технологии в каждом регионе.

В том случае, если объемы производства гибридных семян невелики и при этом важна генотипическая и морфологическая однородность  $F_1$  гибридного потомства, а также защита авторских прав на нелицензированную репродукцию семян, то возможна реализация трехлинейной схемы семеноводства (рис. 7).

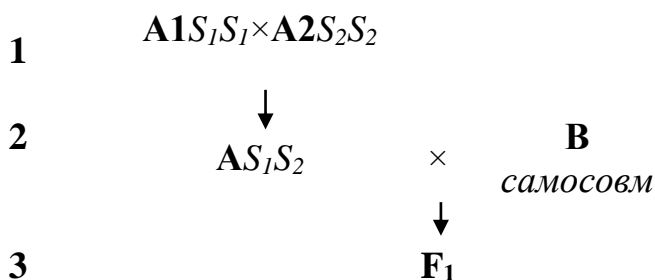


Рис. 7. Трехлинейная схема производства семян  $F_1$  гибридов моркови на основе самонесовместимости

При трехлинейной схеме семеноводства в качестве отцовского компонента рекомендуется использовать самосовместимую линию, при этом гибридные семена убирать только с самонесовместимой материнской линии, поэтому урожайность семян будет на 20-25% ниже, чем при четырехлинейной, а гибриды будут более выровнены за счет



использования в качестве опылителя ЛУГ и исключения реципрокного эффекта.

Реализация двухлинейной схемы семеноводства (рис. 9) возможна при наличии отработанного надежного способа временного преодоления самонесовместимости при размножении родительских линий, для чего А.В. Крючков (2005) рекомендует изучить влияние  $CO_2$  и обработки раствором  $NaCl$  для преодоления самонесовместимости. Двухлинейная схема обеспечивает полную биологическую защиту авторского права, так как невозможно получить семена  $F_2$  поколения.

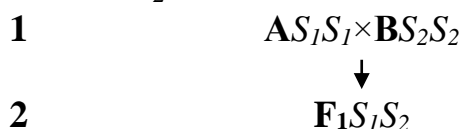


Рис. 8. Двухлинейная схема производства семян  $F_1$  гибридов моркови на основе самонесовместимости

### ВЫВОДЫ

1. Стадию развития микроспор с высокой точностью позволяют определить морфологические признаки соцветия, бутонов и пыльников - одноядерные микроспоры содержатся в пыльниках крайних бутонов двух крайних рядов зонтичков соцветий, у которых крайние зонтики начинают выдвигаться в стороны.
2. Оптимизированный состав питательной среды (B5 с 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 500 мг/л гидролизата казеина, 0,1 мг/л 2,4-D и 0,1 мг/л NAA) в культуре пыльников моркови обеспечивает до 42,5% пыльников, формирующих эмбриониды и каллус.
3. Инкубирование высаженных на питательную среду пыльников моркови при температуре  $+32^\circ C$  в течение 2 дней повышает выход эмбрионидов и каллуса в культуре пыльников в среднем в 2,6 раза, тогда как воздействие низкой положительной температурой  $+5^\circ C$  в течение 2 дней, напротив, приводит к его существенному снижению.
4. Молекулярно-генетическим анализом популяции растений-регенерантов, полученных в культуре пыльников с использованием растения сорта Тайфун, установлена частота формирования растений удвоенных гаплоидов, составляющая 72%.
5. Установлено, что оптимальным сроком введения в культуру размножаемых родительских линий моркови является конец декабря – начало января. При этом наиболее эффективной схемой микроклонального размножения в суспензионной культуре является: прекультивирование каллуса на среде MS с добавлением 1 мг/л или 2 мг/л 2,4-Д с последующим культивированием в жидкой MS со сниженным содержанием 2,4-Д (0,1 мг/л) и индукцией эмбриогенеза на среде MS без регуляторов роста.
6. Показано, что генетико-селекционная схема создания  $F_1$  гибридов моркови на основе самонесовместимости с интегрированными

биотехнологическими методами создания линий – удвоенных гаплоидов и микрклонального размножения родительских линий может быть реализована за 6 лет.

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Использовать генетико-селекционная схема создания  $F_1$  гибридов моркови на основе самонесовместимости с интегрированными биотехнологическими методами создания линий – удвоенных гаплоидов и микрклонального размножения родительских линий.
2. При производстве удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников рекомендуется для индукции эмбрио- и каллусогенеза использовать питательную среду В5 (Gamborg O.L. et al., 1968) с 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 500 мг/л гидролизата казеина, 0,1 мг/л 2,4-D и 0,1 мг/л NAA и проводить температурную обработку высаженных пыльников при  $+32^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Чистова, А.В. Репродукция самонесовместимых линий моркови (*Daucus carota* L.) с использованием культуры тканей / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Известия ТСХА. – 2014. – Вып. 3. – С. 43-50.
2. Чистова, А.В. Влияние температурной предобработки на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников моркови (*Daucus carota* L.) / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Известия ТСХА. – 2014. – Вып. 4. – С. 125-131.
3. Чистова, А.В. Биотехнологические основы селекции  $F_1$  гибридов моркови с использованием самонесовместимости / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Картофель и овощи. – 2014. – Вып.11. – С. 34-35.
4. Чистова, А.В. Получение удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва – 2013. – С. 59-60.
5. Чистова, А.В. Перспективы получения и использования удвоенных гаплоидов в семеноводстве овощных культур / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Научная конференции молодых ученых и специалистов, посвященная 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова: Сборник статей. – М.: Издательство РГАУ-МСХА, 2013.– С. 88-89.
6. Чистова, А.В. Элементы технологии создания удвоенных гаплоидов моркови / А.В. Чистова, С.Г. Монахос // Доклады ТСХА: Сборник статей. Вып. 284. Часть I. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. - С. 483-485.