

УДК 633.11.111

**СОЗДАНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ (*DAUCUS CAROTA* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ****Т.С. Вюртц, Н.А. Шмыкова, М.И. Федорова, Т.В. Заячковская, Е.А. Домблидес***Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур РАН, Московская область, Россия, tajtza@yandex.ru, Edomblides@mail.ru*

Использование биотехнологических подходов позволяет сократить временные затраты на получение гомозиготных генетически стабильных линий. Из трех образцов моркови столовой (*Daucus carota* L.) были получены удвоенные гаплоидные растения через культуру неопыленных семян *in vitro* (61 растение) и через культуру микроспор (5 растений). Наиболее успешной модификацией методик оказалось добавление антибиотика цефотаксима 200 мг/л в культуральную среду. Все адаптированные растения были диплоидными ( $2n=18$ ).

**Ключевые слова:** *Daucus carota* L., ДН-технологии, культура неопыленных семян *in vitro*, культура микроспор.

В условиях постоянно меняющихся запросов рынка и появляющихся новых болезней и вредителей сельскохозяйственных культур существует необходимость ускорения селекционного процесса. В настоящее время для ускорения селекции широко используются технологии получения удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) с использованием культуры пыльников, микроспор и неопыленных семян *in vitro*. Морковь столовая (*Daucus carota* L.) относится к перекрестноопыляемым растениям с двулетним циклом развития, в связи с этим ускоренное получение гомозиготных генетически стабильных линий является актуальной задачей для селекции этой экономически важной овощной культуры. На данный момент существует небольшое количество сообщений об успешном получении удвоенных гаплоидов моркови через культуру пыльников [Тюкавин и др., 1999; Górecka K. et al., 2005; Domblides A., 2014; Шмыкова Н.А., 2006; Чистова А.В., 2015], микроспор [Matsubara et al., 1995; Górecka K., et al., 2010, Li et al., 2012] и неопыленных семян [Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А., 1996; Домблидес А.С., 2001; Тюкавин Г.Б., 2007; Kielkowska A, Adamus A., 2010; Котлярова О.В., 2010]. Критическими факторами для данных технологий являются: генотип донорного растения, технологические сложности выделения пыльников и семян (морковь имеет довольно мелкие генеративные органы), стадия развития мужского и женского гаметофита, длительный период культивации до инициирования эмбриогенеза и каллусогенеза, низкая эффективность получения эмбриоидов, большие потери растений-регенерантов на стадии адаптации к нестерильным условиям, различие в плоидности получаемых растений. Целью работы было получение гомозиготных растений моркови столовой *D. carota* L. с использованием культуры микроспор и неопыленных семян *in vitro*.

Исследование проводили на образцах, относящихся к разным сортотипам (Марлинка (7 растений), Нантская-4 (3 растения), Император (19 растений)). Донорные растения выращивались как в поликарбонатной теплице, так и в климатической камере (при 21–24 °С и 16ч фотопериоде) из корнеплодов, прошедших яровизацию. При отборе бутонов проводили цитологическое изучение стадий развития микроспор и пыльцы, используя методику дифференциального окрашивания [Alexander, 1969] и микроскоп Axio Imager A2 (Zeiss, Германия). Оптимальную стадию развития женского гаметофита определяли по размеру завязи [Домблидес А.С., 2001]. Только при культивировании на стадии зрелого зародышевого мешка происходило образование эмбрионных структур.

Культура микроспор: выделение и культивирование ми-

кроспор проводили по оптимизированной методике, разработанной для рапса [Lichter, 1982] на среде  $\frac{1}{2}$  NLN, pH 5.8 с различной концентрацией сахарозы (13%, 15%, 25%) и добавлением цефотаксима 200 мг/л.

Культивирование неопыленных семян *in vitro* проводили, модифицируя методику, разработанную ранее для моркови [Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А., 1996]. Модификация заключалась в использовании сочетания регуляторов роста (0.2 мг/л 2,4Д и 0.2 мг/л кинетин) и добавлении антибиотика – цефотаксима 200 мг/л в среду, в качестве дополнительного стерилизующего компонента, что помогло снизить потери от развития инфекций.

По сравнению с культурой микроспор использование культуры неопыленных семян *in vitro* оказалось более эффективным для получения ДН-растений. Для растений с цитоплазматической мужской стерильностью эта методика оказалась единственной уникальной возможностью получения удвоенных гаплоидных растений. При культивировании семян через три недели наблюдалось увеличение размеров и их побурение. Число культивируемых семян с индивидуального растения составляло от 7 у Император до 60 у № 258 (с/п Марлинка). Образование эмбрионного каллуса наблюдалось со стороны микропиллярного конца через 5–7 недель от начала культивирования. Исследуемые сортообразцы проявили различную отзывчивость к индукции гиногенеза. Процент отозвавшихся семян варьировал и зависел от генотипа индивидуального растения в сорте Император (от 0 до 50%). В сортах Марлинка и Нантская-4 все растения оказались отзывчивыми и процент семян с гиногенными структурами составлял 28–53%. Всего было получено 62 растения-регенеранта.

Индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор до стадии 2–4 клеток, удалось добиться для всех трех сортов. Однако взрослые растения были получены только из сорта Нантская-4 в количестве 5 шт, которые успешно прошли яровизацию и были высажены для последующего самоопыления.

Критическим этапом является адаптация растений-регенерантов моркови, полученных в условиях *in vitro* к условиям выращивания их *in vivo*. При переносе растений регенерантов в условия с влажностью, которая меньше чем в культуральном сосуде, растения быстро увядали и поражались грибными заболеваниями рода *Fusarium* spp.. Минимизировать эти потери оказалось возможным, используя профилактические обработки препаратом КВАДРИС 250 SC, К.С., сразу после пересадки, через 2-е суток и затем по мере необходимости.

Проведенный цитологический анализ растений-реге-

нерантов, полученных как через культуру микроспор, так и через культуру неопыленных семяпочек *in vitro* показал, что все адаптированные растения были диплоидными ( $2n=18$ ).

Анализируя отечественный и зарубежный опыт, про-

слеживается перспективность разработок ДН-технологий получения удвоенных гаплоидов у растений моркови столовой через культуру неопыленных семяпочек *in vitro* и культуру микроспор, что требует дальнейшей модификации данных методик.

#### Библиографический список (References)

- Домблидес, А.С. Разработка лабораторной технологии получения гиногенных растений моркови *in vitro*: автореферат дис. к. с.-х.н.М., 2001. 23 с.
- Котлярова, О.В. Усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota*): дис. ... к. с.-х. н.: 06.01.05. – М., 2010. 165 с.
- Тюкавин, Г.Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови. М., 2007. 539 с.
- Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А., Монахова М.А. Цитология эмбриогенеза в культуре пыльников моркови // Физиология растений. 1999. Т. 46. N 6. С. 876–883.
- Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А. Культура неопыленных завязей и семяпочек моркови – путь ускоренного получения стерильных линий для гетерозисной селекции // Селекция овощевых і баштанних культур на гетерозис: Тез. Допов. Міжнар. наук. конф. Харків. 1996. С. 82–83.
- Чистова А.В. Совершенствование *in vitro* технологии получения удвоенных гаплоидов для селекции F1 гибридов моркови на основе самонесовместимости: автореферат дис. к. с.-х.н., М., 2015. 18 с.
- Шмыкова, Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур: дис. ... д-ра с.-х. Наук: 06.01.05, 03.00.23. – М., 2006. 365 с.
- Domblides, A. Anther and ovule *in vitro* culture in carrot (*Daucus carota* L.) // Carrot and other Apiaceae, International symposium, 17-19 september 2014, Angers, France. P.28
- Górecka K, Krzyżanowska D, Górecki R (2005) The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. J of Appl Genet 46(3):265–269.
- Górecka, K., U. Kowalska., D. Krzyżanowska. W. Kiszczak. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures // J Appl Genet, 2010. V. 51. P. 141–147.
- Kiełkowska A, Adamus A. *In vitro* culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010/ N 102. P. 309–319.
- Li J.-R., Zhuang F.Y., Ou Ch.-G., Hu H., Zhao Z.-W., Mao J.-H. Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2013. V. 112 P. 275–287.
- Matsubara S., Dohya N, Murakami K, Nishio T, Dore C Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures // Acta Hortic, 1995.V. 392. P. 129–137

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 43–44

### DEVELOPMENT OF DOUBLED HAPLOID LINES (DHS) IN CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.) WITH THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS

T.S. Vjurts, N.A. Shmykova, M.I. Fedorova, T.V. Zayachkovskaya, E.A. Domblides

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, tajtza@yandex.ru, Edomblides@mail.ru

Using biotechnological approaches enables to reduce time-consuming work to develop homozygous and genetically stable breeding lines. Doubled haploid plants through culture of unpollinated ovules (61 plants) and isolated microspores (5 plants) were produced in three accessions of carrot (*Daucus carota* L.). The addition of cefotaxime antibiotic 200 mg/L in cultural medium gave successful results with protocols used. All adapted plants were diploids ( $2n=18$ ).