УДК 631.532/.535:631.527

РЕПРОДУКЦИЯ САМОНЕСОВМЕСТИМЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ

А.В. ЧИСТОВА, С.Г. МОНАХОС

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Показано, что применение метода клонального микроразмножения позволяет решить проблему поддержания и размножения родительских линий моркови в генетико-селекционной схеме селекции гибридов на основе самонесовместимости. В статье приведено сопоставление двух способов микроклонального размножения и показана целесообразность применения каждого из них в зависимости от производственных задач селекционно-семеноводческой работы.

Ключевые слова: каллусная культура, клональное микроразмножение, морковь, самонесовместимость, селекция, семеноводство, суспензионная культура клеток, Fj гибрид.

Государственный реестр на 2013 г. включает 220 сортов и гибридов моркови, 103 из них — Fj гибриды, в основном зарубежной селекции [1]. Большая доля Fj гибридов объясняется их высокой продуктивностью, товарностью, технологичностью.

Для получения Fj гибридов используют ядерно-цитоплазматическую мужскую стерильность — «петалоид» и «браун» [2, 7], соответственно генетико-селекционные схемы предполагают получение трехлинейных гибридов. Трудоемкая сама по себе трехлинейная схема селекции Fj гибридов моркови усложняется олигогенным контролем генов стерильности ядра, взаимодействующих с фактором стерильности цитоплазмы [6]. Кроме того, используемые типы мужской стерильности, «браун» и «петалоид», не всегда гарантируют 100%-ю гибридность семян, так как подвержены влиянию внешних факторов, позволяющих растениям формировать фертильную пыльцу.

Другое биологическое явление, позволяющее контролировать гибридизацию, — самонесовместимость, в практике производства гибридных семян моркови не используется. Известна высокая степень проявления самонесовместимости у моркови, но отсутствие методов временного преодоления ее действия не позволяет создавать инбредные линии и осуществлять размножение родительских линий самоопылением.

Интеграция доступных биотехнологических методов (создание линий — удвоенных гаплоидов, микроклональное размножение родительских линий) в селекционные схемы позволит создавать Fj гибриды моркови на принципиально новой для этой культуры биологической основе — самонесовместимости. При этом произойдет существенное сокращение продолжительности селекционного процесса за счет устранения этапа получения изогенной пары — стерильной линии и линии-закрепителя стерильности, а проблема размножения самонесовместимых родитель-

ских линий коммерческих гибридов будет решена применением клонального микроразмножения.

Морковь — модельный объект многих исследований в области культуры тканей растений. Технология микроклонального размножения для этой культуры разработана и известна много лет [8, 9], однако для ее использования в селекции и семеноводстве необходимо оптимизировать некоторые элементы основной технологии.

Целью данной работы является оптимизация технологии микроклонального размножения моркови для интеграции в генетико-селекционную схему создания Fj гибридов на основе самонесовместимости. Для этого решены следующие задачи: дана сравнительная характеристика эффективности размножения — эмбриогенеза и регенерации в каллусной и суспензионной культуре клеток, разработан хронологический регламент изоляции эксплантов и введения в культуру для своевременного получения цветущих растений моркови.

Материалы и методы

Растительный материал, представленный тремя генотипами моркови: линии На-1, 3с1-1, 3с4-31 — выращивали в открытом и защищенном грунте. Для выделения эксплантов использовали корнеплод (после зимнего хранения), листья, черешки листьев, цветоносные побеги, соцветия 3-го и 4-го порядков.

Стерилизацию проводили 3%-м раствором гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 10 мин с последующей трехкратной промывкой стерильной водой.

Для каллу core неза экспланты культивировали в течение 30-40 дней на питательной среде MS [5] по методике, предложенной Тюкавиным [3], с некоторыми модификациями — с добавлением 2,4-Д в концентрациях: 0,2, 1 и 2 мг/л.

В каллусной культуре растения-регенераты получали культивированием каллуса в течение 40-60 дней на пяти вариантах питательных сред В5 [4] с добавлением: 1) 0,1 мг/л НУК; 2) 0,2 мг/л БАП; 3) 0,1 мг/л кинетина; 4) 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л НУК; 5) без регуляторов роста растений.

В суспензионной культуре моркови исходную суспензию клеток получали в жидких питательных средах MS с добавлением 0,1 мг/л и 1 мг/л 2,4-Д при постоянном покачивании на шейкере при температуре 25-27°С, 80-110 об./мин и субкультивированием на свежей питательной среде каждые 2-3 нед. Для индукции эмбриогенеза суспензию клеток переносили на 15-20 дней на безгормональную среду MS или MS с добавлением 0,1 мг/л АБК, а также культивированием без пересадки в течение 30-40 дней.

Эксперимент, как в каллусной культуре, так и в суспензионной культуре клеток, закладывали в трех повторностях — одна чашка Петри (диаметр 6,0 см) или колба Эрленмейера (250 мл) соответственно в повторности.

Регенерацию/проращивание сеянцев осуществляли культивированием эмбриоидов на твердой питательной среде В5 и в среднем через 3 нед. полученные растения адаптировали к нестерильным условиям в отапливаемой теплице в кассетах с торфом.

Результаты и их обсуждение

Поверхностная стерилизация растительного материала всегда проходила успешно, даже в случае использования тканей корнеплода с головкой, пораженной альтернариозом. Исключением являлись варианты эксперимента, где в качестве экспланта использовали части цветоносного побега и стареющих листьев с видимыми

симптомами поражения заболеванием — в этом случае практически повсеместно наблюдали бактериальное заражение культуры *in vitro.*

Каллусообразование у эксплантов, взятых со всех вышеперечисленных органов растений моркови, проходило на всех вариантах питательных сред MS с добавлением 2,4-Д в концентрациях 0,2, 1 и 2 мг/л. Выявлено качественное морфологическое различие формируемого каллуса на вариантах среды MS с 0,2 мг/л 2,4-Д — каллус бесструктурный бежево-серой окраски и MS с 1 и 2 мг/л 2,4-Д — каллус плотный или рыхлый с зеленовато-бежевой окраской (рис. 1). Следует отметить, что в каллусной культуре растения-регенеранты были получены только при культивировании каллуса, выращенного на среде с добавлением 2 мг/л 2,4-Д, а в суспензионной культуре клеток — с использованием каллуса, выращенного на всех трех вариантах питательных сред.

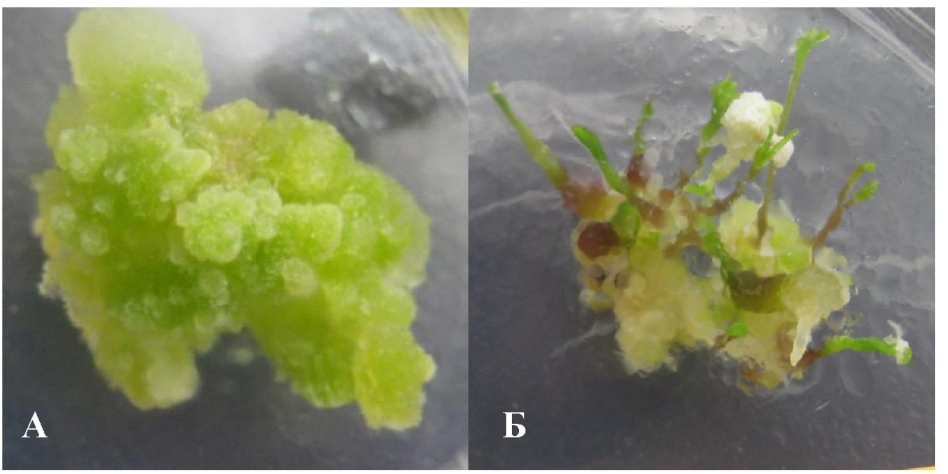

Рис. 1. А— каллус, формирующийся при культивировании высечки корнеплода на среде MS с добавлением 2 мг/л 2,4-Д; Б — формирование растений-регенерантов (среда B5 без добавления гормонов)

Каллусная культура. В каллусной культуре использовали дедифференцированные ткани трех линий, сформировавшиеся на среде MS + 2 мг/л 2,4-Д. Двухфакторный дисперсионный анализ влияния состава питательной среды культуры каллуса, генотипа исходного донорного растения и взаимодействия двух этих факторов на формирование растений-регенерантов моркови указал на наличие статистически достоверного различия вариантов опыта. Число растений, формирующихся в каллусной культуре на одну чашку Петри, содержащую около 0,2 г каллусной массы, составило от 0,0 растений для генотипа На-1 на среде B5 + 0,1 мг/л НУК до 15,3 растений на одну чашку Петри для генотипа Зс1-1 на среде B5 без гормонов (б.г.) — лучший вариант опыта (табл. 1), общая средняя составила 6,8 растений моркови на чашку Петри.

Таким образом, наиболее эффективным из представленных вариантов размножения моркови в каллусной культуре является получение каллуса культивированием эксплантов на среде MS + 2мг/л 2,4-Д с последующей регенерацией на среде B5 без добавления регуляторов роста. Следует отметить, что в каллусной культуре су-

Таблица 1

Среднее число растений моркови трех генотипов, полученных в каллусной культуре, шт.

Питательная среда (Б)	Генотип (А)			Средние значения
	На-1	3с1-1	3с4-31	
В5 + 0,2 мг/л БАП	2,3	9,0	10,7	7,3
В5 + 0,1 мг/л НУК	0,0	12,0	3,3	5,1
В5 + 0,1 мг/л кинетина	5,0	7,0	10,3	7,4
В5 + 0,1 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л НУК	4,3	1,0	2,0	2,4
В5 без регуляторов роста	8,0	15,3	12,0	11,8
Средние значения	3,9	8,9	7,7	6,8

$НСР_{05}$ генотип (А) — 4,1; $НСР_{05}$ питательная среда (Б) — 5,4;
$НСР_{05}$ взаимодействия (АхБ) — 9,3.
Доля влияния фактора А (генотипа) — 31%, фактора Б (среды) — 17%, взаимодействия А и Б — 25%, случайные отклонения — 27%.

щественным оказалось влияние генотипа, в связи с чем на практике следует обязательно учитывать этот факт.

Суспензионная культура. В суспензионной культуре клеток образование хорошо развитых эмбриоидов происходило из каллусов, полученных на всех трех вариантах сред MS (с добавлением 0,2, 1 и 2 мг/л 2,4-Д). Эмбриоиды формировались как в жидких средах для эмбриогенеза (MS б.г., MS + 0,1 мг/л АБК) (рис. 2) через 2-4 нед. культивирования, так и в средах для получения клеточной суспензии (MS + 0,1 мг/л 2,4-Д, MS + 1 мг/л 2,4-Д) (рис. 3) при продолжительном культивировании без пересадки в течение 4-6 нед. (табл. 2).

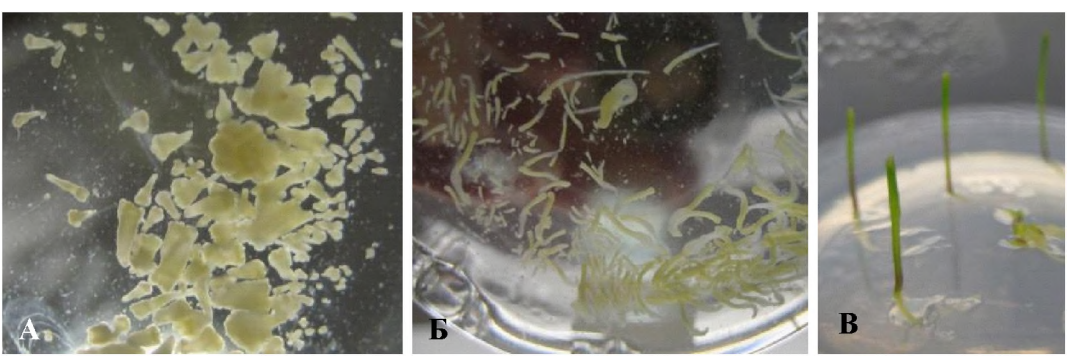

Рис. 2. А — эмбриоиды в жидкой среде MS б.г. через 3 нед. культивирования; Б — эмбриоиды в жидкой среде MS б.г. через 4 нед. культивирования; В — проростки, полученные на жидкой среде MS б.г., через 4 дня культивирования на твердой среде В5

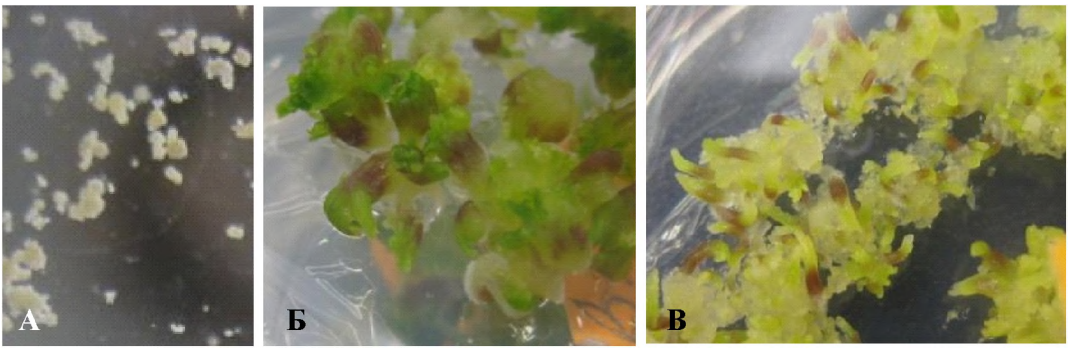

Рис. 3. А— эмбриоиды в жидкой среде MS + 1 мг/л 2,4-Д через 4 нед. культивирования; Б — прорастание эмбриоидов, полученных на жидкой среде MS + 1 мг/л 2,4-Д, через 1,5 нед. культивирования на твердой среде В5; В — прорастание эмбриоидов, полученных на жидкой среде MS + 0,1 мг/л 2,4-Д, через 1 нед. культивирования на твердой среде В5

Таблица 2

Среднее потрем генотипам моркови, На-1, 3с1-1, 3с4-31, число эмбриоидов, полученных в суспензионной культуре клеток, шт.

Культивирование суспензии клеток	Индукция эмбриогенеза (Б)	Питательная среда для каллусогенеза (А)			Средние значения
		MS +0,2 мг/л 2,4-Д	MS + 1 мг/л 2,4-Д	MS + 2 мг/л 2,4-Д	
MS + 0,1 мг/л 2,4-Д	Без пересадки	0	66,7	50,0	38,9
	MS б.г.	83,3	216,7	200,0	166,7
	MS + 0,1 АБК	0	0	0	0
MS + 1 мг/л 2,4-Д	Без пересадки	16,7	66,7	133,3	72,2
	MS б.г.	0	0	16,7	5,6
	MS + 0,1 АБК	0	100,0	0	33,3
Средние значения		16,7	75,0	66,7	52,8

$НСР_{05}$ питательная среда для каллусогенеза (А) — 48,4; $НСР_{05}$ индукция эмбриогенеза (Б) — 68,5; $НСР_{05}$ взаимодействия (А*Б) — 118,7.

Доля влияния фактора А (питательная среда для каллусогенеза) — 34%, фактора Б (индукция эмбриогенеза) — 8%, взаимодействия А и Б — 8%, случайные отклонения — 50%.

Статистическая обработка данных суспензионной культуры клеток выявила отсутствие существенного влияния генотипа линий на выход сформировавшихся растений, поэтому данные таблицы 2 представлены средними по трем линиям На-1, 3с1-1, 3с4-31 моркови.

Как видно из таблицы 2, варьирование выхода сеянцев при применении суспензионной культуры клеток составило от 0 до 216,7 шт. на колбу, в среднем по опы-

ту получено 52,7 проростков на одну колбу. В результате проведенного эксперимента показано, что наиболее эффективным для получения массового количества сеянцев моркови *in vitro* является использование следующей схемы: прекультивирование каллуса на среде MS + 1 мг/л 2,4-Д и MS + 2 мг/л 2,4-Д с последующим культивированием в жидкой среде MS + 0,1 мг/л 2,4-Д и индукцией эмбриогенеза на безгормональной среде MS.

Сильное влияние на эффективность метода клонального микроразмножения оказывает этап адаптации, ключевыми факторами которого являются температура и уровень освещенности. Так, весной при температуре 18-22°С приживаемость растений достигала 100%, в летние месяцы при температуре выше 30°С — не более 64%. При низкой температуре поздней осенью и зимой процент адаптировавшихся растений не превышал 75%, их рост сильно задерживался, однако цветение происходило следующим же летом (июль — август). При адаптации ранней весной (март — апрель) яровизацию прошло 38% растений.

Выбор способа размножения (каллусная культура на твердой агаризованной среде или суспензионная культура клеток) при размножении селекционного материала определяется необходимым количеством клонов, количеством исходного материала для введения в культуру, трудозатратами. В каллусной культуре растения-регенеранты можно получить за два месяца с момента введения в культуру, при этом метод ограничивается высокой по сравнению с суспензионной культурой клеток трудоемкостью и невысоким выходом растений (400-500 шт. с одного корнеплода моркови среднего размера).

Суспензионная культура клеток позволяет получить с одного корнеплода моркови за 3-3,5 мес. неограниченно большое число растений (100-150 тыс. сеянцев). Кроме того, ее преимуществом является сравнительная легкость и быстрота работы с большим количеством эмбриогенных клеток. Общий объем суспензии можно увеличивать в 5 раз каждые 2-3 нед. Этот метод позволяет получить неограниченное число сеянцев, что дает возможность отбирать проростки с крепким подсемядольным коленом и хорошо развитым корнем для гарантированной адаптации и быстрого роста (рис. 4) и обеспечения эффективного размножения родительских линий при гибридном семеноводстве.

Рис. 4. Растения-регенеранты моркови, полученные на твердой питательной среде B5

При выборе времени и способа микроклонального размножения также нужно учитывать планируемые сроки яровизации и цветения. Преимущество адаптации весной и в начале лета состоит в том, что происходит быстрый рост растений, к осени получаются крупные корнеплоды, а на следующий год — более мощные семенники. Введение в культуру тканей моркови летом позволяет получить растения осенью или зимой, а цветение и семена — на следующий же вегетационный период.

Для поддержания непрерывной цепи мероприятий при переходе от селекции F1 гибридов моркови на основе самонесовместимости к их семеноводству оптимальным сроком введения в культуру *in vitro* размножаемых родительских линий является

конец декабря — начало января. Это обеспечит получение в суспензионной культуре клеток необходимого количества сеянцев, адаптированных к началу мая. 1-10 июня 30-дневную рассаду высаживают в открытый грунт для выращивания в последующие 4 мес. штеклингов, диаметр которых к концу вегетационного периода должен составлять не менее 10 мм. В первых числах октября штеклинги скрещиваемых самонесовместимых родительских линий пересаживают в отдельную зимнюю теплицу (м.б. пленочная теплица с аварийным обогревом), где происходит яровизация, цветение и гибридизация растений.

Заключение

В каллусной культуре каллус получен при культивировании тканей на среде MS + 2 мг/л 2,4-Д. Наиболее эффективной средой для регенерации растений моркови является В5 без добавления регуляторов роста.

В суспензионной культуре наиболее эффективным для получения массового количества сеянцев моркови *in vitro* является использование следующей схемы: прекультивирование каллуса на среде MS с добавлением 1 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.

Наиболее предпочтительным для использования в семеноводстве является метод суспензионной культуры клеток. Оптимальным сроком введения в культуру размножаемых родительских линий является конец декабря — начало января.

Библиографический список

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию [Электронный ресурс] / ФГБУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений». М., 2013. URL: http://www.gossort.com/ree_cont.html (Дата обращения: 03.12.2013).
2. *Леунов В.И.* Столовые корнеплоды в России / В.И. Леунов. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. 272 с.
3. *Тюкавин Г.Б.* Основы биотехнологии моркови: Монография / Г.Б. Тюкавин. М.: ВНИИССОК, 2007. 480 с.
4. *Gamborg O.L.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima. Exp. Cell. 1968. Res. 50. P. 151-158.
5. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures /T. Murashige, F. Skoog. Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473-497.
6. *Nothagel T.* Male sterility in populations of *Daucus* and the development of alloplasmic male sterile lines of carrot / T. Nothagel, P. Straka, B. Linke. Plant Breeding. 2000. V. 119. P. 145-152.
7. *Stein M.* Review Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.) / M. Stein, T. Notlmagel. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Plant Breeding. 1995. V. 114. P. 1-11.
8. *Steward F.* Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells / F.C. Steward, M.O. Mapes, J. Smith / Am. J. Bot. 1958. V 45. P. 693-703.
8. *Thorpe T.A.* Vol. 318: Plant Cell Culture Protocols/T. A. Thorpe //History of Plant Tissue Culture in: Methods in Molecular Biology, Second Edition. Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vazquez-Flota. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006. P. 9-32.

MAINTAINANCE AND REPRODUCTION OF CARROT *CDAUCUS CAROTA* L.) SELF-INCOMPATIBLE LINES BY TISSUE CULTURE

A.V. CHISTOVA, S.G. MONAKHOS

(RSAU- MAA named after KA. Timiryazev)

The aim of the study is optimization of carrot clonal micropropagation technology so that it could be integrated into F_1 hybrid breeding and seed production schemes based on carrot self-incompatibility. It is shown that any vegetative (roots, leaves) and generative (flowering shoots, inflorescence) organ and tissue of a plant can be used as a source of explant, except for old and severely damaged by disease organs. Two ways of in vitro culture — callus culture and suspension cell culture were investigated. The most effective callus culture procedure is callus formation by explants culturing on MS + 2 mg/12,4-D medium followed by culturing on regeneration B5 medium without plant growth regulators. In suspension cell culture the largest number of embryos and regenerated seedlings has been obtained by sequence of culturing on solid MS + 1-2 mg/1 2,4-D for callus formation followed by culturing on liquid MS +0,1 mg/12,4-D and then induction of embryogenesis by subculturing on MS with no plant growth regulators. Suspension cell culture is the most preferable for use in hybrid seed production and the optimal time ofparental lines introducing into tissue culture for propagation in central Russia is the last decade of December —first decade of January.

Key words: breeding, callus culture, carrot, cell suspension culture, clonal micropropagation, Fj hybrid, seed production, self-incompatibility.

Чистова Анастасия Викторовна — асп. кафедры селекции и семеноводства садовых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; тел. (499) 976-41-71; e-mail: chistovan@mail.ru).

Монахос Сократ Григорьевич — к. с.-х. н., доц., зав. кафедрой селекции и семеноводства садовых культур РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; тел. (499) 976-41-71; e-mail: cokrat@hotbox.ru).

Chistova Anastasiya Viktorovna — PhD student of the department of breeding and seed production of horticultural crops, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 976-41-71; e-mail: cliistovan@mail.ru).

Monakhos Sokrat Grigoryevich — PhD in Agricultural Sciences, associate professor, head of the department of breeding and seed production of horticultural crops, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 976-41-71; e-mail: cokrat@hotbox.ru).