

УДК 635.132:631.527.8

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭМБРИО- И КАЛЛУСОГЕНЕЗА
В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA* L.)

А.В. ЧИСТОВА, С.Г. МОНАХОС

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

На двух генотипах моркови изучено влияние температурной обработки и состава питательной среды на эмбриогенную отзывчивость микроспор в культуре пыльников. Выявлено стимулирующее воздействие температурной предобработки изолированных пыльников при $t +32^{\circ}\text{C}$ в течение 2 дней и ингибирующее воздействие предобработки $+5^{\circ}\text{C}$ в течение 2 дней. Среда MSm с добавлением 0,2 мг/л 2,4-D и 500 мг/л гидролизата казеина и среда B5 с добавлением 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 0,1 мг/л 2,4-D, 0,1 мг/л NAA и 500 мг/л гидролизата казеина являются наилучшими вариантами в производстве растений регенератное в культуре пыльников. Процент отозвавшихся пыльников в зависимости от варианта составил от 0 до 88,3%.

*Ключевые слова: удвоенные гаплоиды, культура пыльников, морковь, температурная предобработка, *Daucus carota* L.*

В практике современного овощеводства существует тенденция внедрения F₁ гибридов, отличающихся генетической однородностью и высокой морфологической выравненностью [1, 9]. Однако создание родительских линий моркови затруднено проявляющейся в разной степени гаметофитной самонесовместимостью. Применение технологии получения линий удвоенных гаплоидов позволит исключить необходимость поколений самоопыления и ускорить селекционный процесс [6].

По созданию удвоенных гаплоидов моркови известно несколько работ, в том числе и отечественных ученых, описывающих применение технологии культивирования пыльников, микроспор и семян. Хотя культура изолированных микроспор имеет неоспоримое преимущество перед культурой пыльников, заключающееся в отсутствии риска соматического эмбриогенеза, большая часть опубликованных работ содержит описание получения удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников [3, 4, 6, 7, 10]. При этом авторы исследований отмечают необходимость совершенствования технологии для повышения эффективности получения эмбриоидов, растений-регенерантов и адаптированных к нестерильным условиям растений, так как необходимо обеспечить массовое производство линий удвоенных гаплоидов для оценки их комбинационной способности.

В ряде исследований отмечено стимулирующее влияние низких или высоких температур на эмбриогенную способность микроспор, однако эти сведения довольно противоречивы. Так, S.B. Andersen с соавторами (1990) лучший результат получили

при 1-дневной холодовой предобработке зонтиков до введения пыльников в культуру при температуре +7°C, однако этот вариант существенно не отличался от вариантов с отсутствием или 2-дневной холодовой предобработкой, в то время как при 4 и 12 днях наблюдали существенное снижение отзывчивости пыльников, а при 6 днях отмечали второй период позитивного влияния с относительно высокой отзывчивостью. В исследованиях Г.Б. Тюкавина [3] предварительное культивирование изолированных пыльников моркови при низкой и высокой температуре было неэффективно, однако холодовая предобработка соцветий, до выделения пыльников, оказала положительное влияние на эффективность каллусогенеза и эмбриогенеза в культуре пыльников моркови. Zhuang с соавторами [10] отмечают, что при культивировании пыльников моркови предобработка +4°C в течение 2-3 дней и затем +32°C в течение 2 дней оказывала позитивное действие только на некоторые образцы.

Целью данной работы является уточнение влияния температурной предобработки на получение удвоенных гаплоидов в культуре пыльников моркови, а также определение оптимальных условий культивирования пыльников.

Материалы и методы

В культуру вводили пыльники растений двух генотипов: F₁ Кантербюри и F₁ Навал (Bejo Zaden B.V.). Растения выращивали в условиях защищенного грунта по общепринятой методике с соблюдением агротехнических мероприятий для получения семенников.

Растительный материал, соцветия, отбирали по морфологическим признакам (плоские или чуть вогнутые соцветия, крайние зонтики которых начинали выдвигаться в стороны). Стадию развития микроспор определяли микроскопированием клеток пыльников с использованием красителей DAPI и ацетокармина. В культуру вводили пыльники, содержащие преимущественно одноядерные микроспоры.

Поверхностную стерилизацию бутонов проводили 2%-м раствором гипохлорита натрия (NaOCl) с добавлением двух капель поверхностно активного вещества Твин 20 в течение 10 мин, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Из бутонов при помощи тонкого пинцета извлекали пыльники, полностью удаляя тычиночные нити. Пыльники помещали на твердую питательную среду в пластиковые чашки Петри диаметром 6 см по 35-45 пыльников на чашку. Чашки Петри по боковой поверхности плотно оборачивали пищевой пленкой.

Пыльники культивировали на питательных средах следующего состава:

КП1 — В5 [5] с добавлением 500 мг/л глутамин, 100 мг/л серина, 0,1 мг/л 2,4-D, 0,1 мг/л NAA и 100 г/л сахарозы, рекомендованной К. Goreska с соавторами (2009);

КП2 — В5 с добавлением 1 мг/л 2,4-D, рекомендованной К.Л. Ни с соавторами (1993);

КП3 — MSm [8] с добавлением 0,2 мг/л 2,4-D и 500 мг/л гидролизата казеина, рекомендованной Б.Г. Тюкавиным (2010);

КП7 — В5 с добавлением 500 мг/л глутамин, 100 мг/л серина, 0,1 мг/л 2,4-D, 0,1 мг/л NAA и 500 мг/л гидролизата казеина.

Введенные в культуру пыльники в течение 2 дней подвергали воздействию низкой положительной (+5°C) или высокой (+32°C) температуры. Для этого чашки

Петри с пыльниками помещали в термостат или в холодильник. В качестве контроля использовали культивирование без температурной предобработки.

После температурной обработки, проходившей в темноте, пыльники культивировали в климатической камере при температуре +24°C, влажности 40%, также в темноте. Через 2-6 мес. образовавшиеся эмбриониды и каллус пересаживали на питательную среду В5 без добавления регуляторов роста [6] и культивировали в условиях климатической камеры при температуре +24°C, влажности 40% и фотопериоде 16 ч день, 8 ч ночь. По мере регенерации растений из эмбрионидов и каллуса в течение 1-3 нед. проводили пересадку на свежую среду того же состава. Дорастивание растений-регенерантов проводили 2-3 нед., после чего их извлекали из контейнеров, тщательно отмывали корни от питательной среды, сажали в кассеты с торфом и накрывали чистыми пластиковыми контейнерами или пленкой на 3-7 дней для поддержания высокой влажности в период адаптации. Адаптацию проводили в поликарбонатной теплице. Уровень плоидности растений-регенерантов определяли прямым подсчетом хромосом в меристематических клетках корней, для чего готовили препараты методом распластывания клеток [2].

Результаты и обсуждение

Влияние температурной предобработки было идентичным для двух генотипов. Инкубирование в течение 2 дней в холодильнике имело резко негативное влияние на индукцию эмбрио- и каллусогенеза, после него процент отозвавшихся пыльников не превышал 1%. Воздействие высокой температурой +32°C в течение 2 дней оказало статистически доказанный положительный эффект, особенно при культивировании на средах КП3 и КП7, благодаря такой обработке процент отозвавшихся пыльников в зависимости от варианта составил 5,8-88,3%. При культивировании пыльников Fj Кантербюри на среде КП3 в одной из повторностей отзывчивость проявили 39 из 40 пыльников (97,5%).

Кроме того, в культуре пыльников Fj Кантербюри эмбрио- и каллусогенез отметили через 2 мес. после высокотемпературной обработки, тогда как без нее — только через 4 мес. В культуре пыльников Fj Навал во всех вариантах отзывчивость отмечали через 2 мес. культивирования (рис. 1).

Наибольшую отзывчивость пыльников наблюдали при культивировании на питательных средах КП3 и КП7, а на среде КП3 происходило каллусообразование даже после воздействия низкой температурой (табл. 1,2).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал наличие влияния температурного шока и состава питательной среды на эффективность эмбрио- и каллусогенеза в культуре пыльников обоих генотипов. Доля влияния температурной предобработки составила 42 и 45%, доля влияния состава среды — 21% у обоих генотипов, доля влияния взаимодействия двух факторов — 30 и 18%, доля случайных отклонений — 7 и 17% соответственно.

После пересадки на среду В5 без регуляторов роста эмбриониды прорастали в растения, аналогичные сеянцам, а каллус дифференцировался в эмбриониды или непосредственно в проростки (рис. 2). Также наблюдали формирование деформированных растений и вторичных эмбрионидов, которые прорастали на месте образования. Растения, полученные в результате вторичного эмбриогенеза, дорастивали и адаптировали к условиям теплицы, чтобы снизить риск потери линии при адаптации.

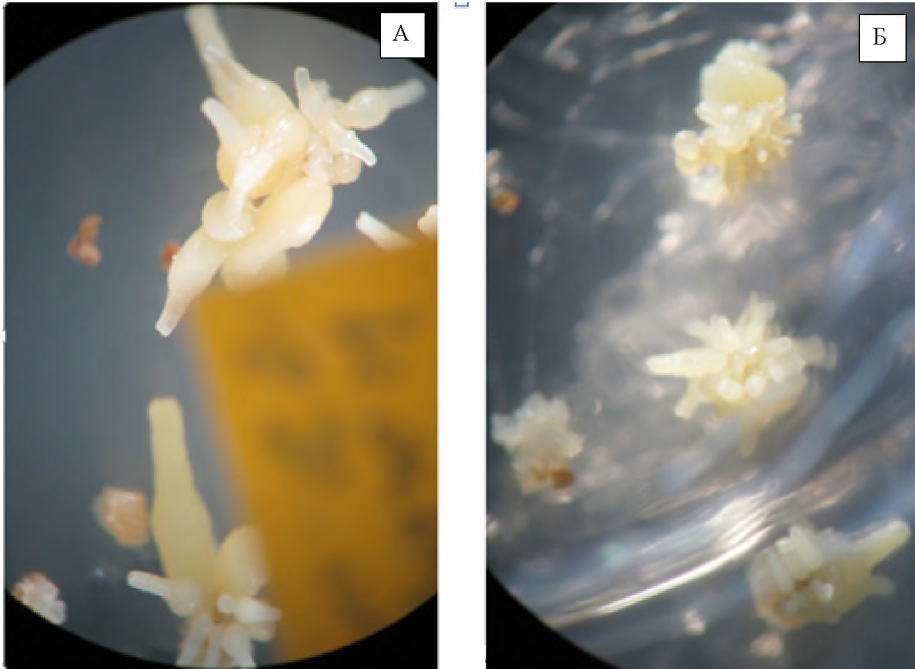


Рис. 1. Эмбриониды, образовавшиеся в культуре пыльников, через два месяца после введения в культуру и высокотемпературной обработки: А — F₁, Кантербюри на среде КП7; Б — F₁, Навал на среде КП7

Таблица 1

Среднее число отозвавшихся пыльников растения F₁ Кантербюри после температурной обработки, шт.

Температурная обработка (А)	Питательная среда (В)				
	КП1	КП2	КП3	КП7	средние
Без обработки	4,3	1,3	9,7	3,3	4,7
+32°C	5,0	8,3	35,3	14,7	15,8
+5°C	0	0	0,7	0	0,2
Средние	3,1	3,2	15,2	6,0	6,9

НСР₀₅ А (температурная обработка) — 4,9; НСР₀₅ В (состав питательной среды) — 5,6; НСР₀₅ АВ (взаимодействия двух факторов) — 9,8.

Среднее число отозвавшихся пыльников растения F₁ Навал после температурной обработки, шт.

Температурная обработка (А)	Питательная среда (В)				
	КП1	КП2	КП3	КП7	Средние
Без обработки	3,0	0,7	8,7	17,0	7,3
+32°C	14,0	2,3	24,3	22,0	15,7
+5°C	0	0	0,3	0	0,1
Средние	5,7	1,0	11,1	13,0	7,7

HCP_{05} А (температурная обработка) — 6,9; HCP_{05} В (состав питательной среды) — 8,0; HCP_{05} АВ (взаимодействия двух факторов) — 13,9.



Рис. 2. А — прорастание эмбрионов, полученных на среде КП7 в культуре обработанных температурой +32°C пыльников растения F₁ Навал, через 8 дней после пересадки на среду В5;
Б — доращивание на среде В5

В результате культивирования пыльников растения Fj Кантербюри было получено 62 регенеранта, в культуре пыльников растения Fj Навал — 137 регенерантов, процент адаптации составил 72,1 и 69,8% соответственно. При подсчете хромосом в корневых меристемах растений, полученных в культуре пыльников Fj Навал и Fj Кантербюри, было обнаружено по 18 хромосом, диплоидный набор.

Заключение

Культивирование при температуре +5°C в течение 2 дней после введения пыльников в культуру ингибирует эмбрио- и каллусогенез, при температуре +32°C — повышает отзывчивость пыльников в среднем в 2,6 раза по сравнению с культивированием без температурной предобработки, что позволяет получить большее количество растений-регенерантов — потенциальных родительских линий. Лучшие результаты были получены при культивировании на питательных средах M5m с добавлением 0,2 мг/л 2,4-D и 500 мг/л гидролизата казеина и B5 с добавлением 500 мг/л глутамина, 100 мг/л серина, 0,1 мг/л 2,4-D, 0,1 мг/л NAA и 500 мг/л гидролизата казеина.

Библиографический список

1. Леунов В.И. Столовые корнеплоды в России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. 272 с.
2. Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике растений. М.: КолосС, 2007. С. 99-100.
3. Тюкавин Г.Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови. М.: 2007. 539 с.
4. Andersen S.B., Christiansen I., Farestreit B. Carrot (*Daucus carota* L.): In vitro production of haploids and field trials // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 1990. Vol. 12 (6). P. 393-402.
5. Gamborg O.I., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell*. 1968. V 50. P. 151-158.
6. Gorecka K., Krzwanowska D., Kiszczak W., Kowalska U., Gdrecki R. Carrot Doubled Haploids. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer, 2009. P. 231-239.
7. Hu K.L., Matsuhara S., Murakami K. Haploid Plant Production by Anther Culture in Carrot (*Daucus carota* L.) // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 1993. Vol. 62 (3). P. 561-565.
8. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473-497.
9. Simon Ph., Freeman R., Vieira J., Boiteux I., Briard M., Nothnagel T., Michalik B., Kwon Y. Carrot. *Vegetables II / Handbook of Plant Breeding*. Springer, 2008. Vol. 2. P. 327-357.
10. Zhuang F.Y., Pei H.X., Ou C.G., Hu H., Zhao Z.W., Li J.R. Induction of microspore-derived embryos and calli from anther culture in carrot // *Acta Hort. Sinica*. 2010. Vol. 37 (10). P. 1613-1620'.

EFFECT OF TEMPERATURE TREATMENT ON ANTHHER CULTURE OF CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.)

A.V. CHISTOVA, S.G. MONAKHOS

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

The aim of the study is to identify the best temperature treatment for doubled haploids production in anther culture of carrot in order to improve the technology of lines production for F1 hybrids. It is shown that low temperature treatment by +5°C for 2 days reduces embrvoids and callus formation. High temperature treatment by +32°C during 2 days increases potential for embrvoids and callus formation on average by 2.6 times in comparison with culturing without temperature treatment. The best results were obtained in MSm medium with addition of 0.2 mg/l of 2.4-D and 500 mg/l casein hvdrolvsate as well as in B5 medium with addition of 500 mg/l of glutamine, 100 mg/l of serine, 0.1 mg/l of 2.4-D, 0.1 mg/l of NAA, and 500 mg/l of casein hvdrolvsate. Also high temperature treatment induced embryo and callus genesis in anther culture of Fj Canterbury carrot after 2 months of cultivation, while without treatment it was obsened only after 4 months of cultivation.

Key words: doubled haploids, anther culture, carrot, temperature treatment.

Чистова Анастасия Викторовна — асп. кафедры селекции и семеноводства садовых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; тел. (916) 611-94-64; e-mail: cliistovan@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@hotmail.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. (916) 611-94-64; 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@hotmail.ru).