

А. С. Булахова, младший научный сотрудник

И. В. Павлова, кандидат биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник

РУП «Институт овощеводства», аг. Самохваловичи, Минский район

СОЗДАНИЕ *IN VITRO* КУЛЬТУРЫ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ (*DAUCUS CAROTA* L.) С ПЕТАЛОИДНЫМ ФЕНОТИПОМ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований влияния гормональных регуляторов роста на культуру in vitro моркови столовой с различными фенотипами мужской стерильности. Выявлены оптимальные концентрации в композиции гормонов 6-бензиламинопурина и α -нафтил-уксусной кислоты, необходимые для быстрого прямого получения регенерантов из срезов вегетативных и генеративных органов семенных растений моркови столовой, а также выделен наиболее отзывчивый на культивирование in vitro фенотип с петалоидным типом мужской стерильности цветка из образца Романс F₁.

Ключевые слова: морковь столовая (*Daucus carota* L.), петалоидный тип мужской стерильности цветков, культура *in vitro*, 6-бензиламинопурина, α -нафтил-уксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Морковь столовая является хорошо изученным модельным объектом в сельскохозяйственной биотехнологии. В конце прошлого века была заложена фундаментальная основа применения биотехнологии для развития гибридных систем моркови столовой на основе цитоплазматической мужской стерильности [1]. Имеется указание на то, что сама технология культивирования *in vitro* может индуцировать появление растений с петалоидным типом мужской стерильности цветка [2]. Современные научные исследования физиологии развития моркови столовой показали возможность получения F₁ гибридов на основе самосовместимости. Для этого материнский компонент производят клональным микроразмножением самонесовместимых родительских линий [3].

В настоящее время в РУП «Институт овощеводства» ведется работа по созданию F₁ гибридов моркови столовой с использованием в качестве материнского компонента изогенной пары: линии с мужской стерильностью и линии закрепителя стерильности. В связи с этим в данной работе использованы пробирочные условия для создания и поддержания коллекции мужски стерильных тестеров моркови столовой. Эта задача актуальна на этапе поддержания этих тестеров во время отбора фертильных аналогов, закрепляющих

стерильность. Подбор закрепителей стерильности при создании материнских линий гибридов F_1 моркови столовой затруднен в связи с большим полиморфизмом фенотипов мужской стерильности и возможен только путем проведения тест-кроссов и их анализа в течение двух-трех лет [4].

Практическая значимость данного исследования заключается в применении клонального микроразмножения отзывчивых форм для получения тестеров в количестве, достаточном для идентификации закрепителей стерильности и проведения тест-кроссов. Разрабатываемый метод позволит поддерживать коллекцию тестеров на период, необходимый для эффективного отбора закрепителей стерильности в одновременно проводимых полевых опытах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследовании использовали семенные растения моркови столовой сорта Лявониха и образца Романс F_1 , выращенные в открытом грунте на опытном поле РУП «Институт овощеводства» из яровизированных в ходе зимнего хранения корнеплодов. В качестве модельных объектов из 16-ти семей, выделенных в предыдущих исследованиях от растений моркови столовой с браупили петалоидным типом мужской стерильности цветка, выбрали лучшие растения с определенным типом мужской стерильности цветка. Контролем выступило лучшее фертильное растение моркови столовой сорта Лявониха.

Для культивирования *in vitro* в качестве эксплантов использовали поперечный срез молодых побегов (срез побега), пазуху листа с небольшим участком стебля (срез узла) и основание элементарного зонтичка из соцветия (основание зонтичка). Чтобы исключить конкуренцию между многочисленными побегами, формирующимися у семенных растений моркови, модельные растения формировали в один центральный стебель. Остальные побеги, отходящие от верхушки корнеплода, удаляли в период роста растения до начала цветения. Чтобы получить большое количество молодых побегов, у модельных растений после начала цветения удаляли большинство соцветий на побегах 3-го и 4-го порядка. В результате у опытных растений активировался рост пазушных меристем и наблюдался рост дополнительных новых молодых побегов в течение всего периода цветения опытных растений. В этот же период осуществляли взятие эксплантов.

Микроклональное размножение включало отбор первичного экспланта, создание асептической культуры *in vitro* и опыт по подбору концентрации гормональных добавок в питательную среду для индукции роста и развития побегов из тканей эксплантов с цветущего растения [5, 6]. Экспланты стерилизовали в 0,5 %-м растворе гипохлорида натрия и 3-кратно промывали в стерильной дистиллированной воде [3]. В качестве питательной среды использовали среду Murashige-Skoog [7]. Благодаря большому количеству результатов научных исследований по условиям индукции морфогенеза тканей моркови столовой *in vitro* в качестве гормонального индуктора побегообразования выбрали 6-бензиламинопурин (БАП) [3]. Для индукции прямого морфогенеза из тканей эксплантов моркови столовой использовали дополнительный компонент α -нафтил-уксусную

кислоту (НУК) на основании ранее полученных в РУП «Институт овощеводства» результатов исследований. В итоге изучали действие разных соотношений концентраций в композиции гормональных регуляторов роста: БАП 2 мг/л и НУК 2 мг/л (B_2N_2); БАП 2 мг/л и НУК 1 мг/л (B_2N_1); БАП 2 мг/л и НУК 0,1 мг/л ($B_2N_{0,1}$). Каллусную культуру получали на среде $B_2N_{0,1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цветение семенных растений образцов моркови столовой началось во второй декаде июня. Фенотип цветка определяли, когда у растений формировалось первое соцветие. В результате были отобраны и для удобства поиска на опытном поле помечены флажками растения с браун- и петалоидным типом мужской стерильности (рис. 1). В ходе цветения на растениях происходило постоянное развитие цветоносных побегов, в результате чего формировалось большое число соцветий. Такой габитус способствовал возникновению сильной конкуренции за питательные вещества и пространство между генеративными и вегетативными органами растения. Поэтому у опытных растений оставляли один главный побег, а дополнительные побеги, отходящие от верхушки корнеплода, удаляли (рис. 2). Для получения эксплантов отобрали несколько лучших растений без внешних признаков болезней с различными фенотипами мужской стерильности цветка.

Во второй декаде июня от лучших семенных растений начали получать экспланты. Из побега диаметром до 5 мм делали срез толщиной до 5 мм. Эксплант – срез узла с молодого побега – обязательно содержал неповрежденную пазушную почку. Из генеративных органов получали экспланты в виде основания зонтика. Каждый тип эксплантов от растений с определенным фенотипом мужской стерильности вводился в культуру в количестве 30 шт. на каждом варианте питательной среды, в несколько подходов, по мере появления новых побегов на опытных растениях после удаления соцветий с побегов 3-го и 4-го порядка. В эксперименте оценивалось количество регенерировавших эксплантов на 30-е сутки культивирования (табл.).

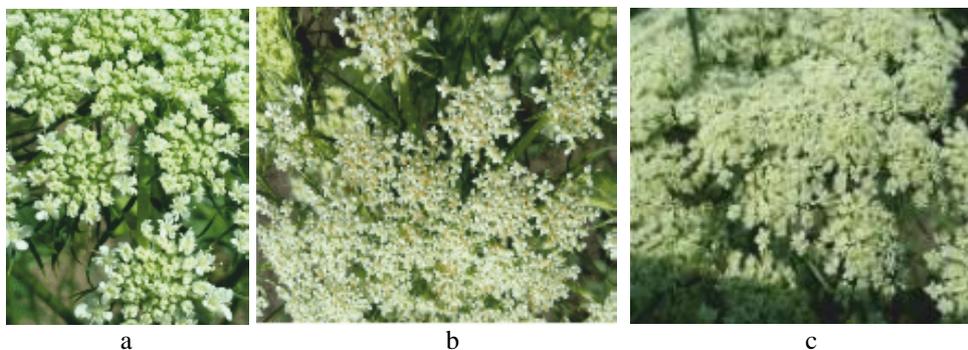


Рисунок 1 – Оценка растений на фенотип мужской стерильности цветка:
а – соцветие с нормальными цветками; б – цветки имеют деформированные коричневые пыльники (браун-тип мужской стерильности цветка);
с – вместо тычинок в цветках сформированы чашелистики (петалоидный тип цветка)



Рисунок 2 – Развитие семенного растения к фазе созревания семян:
 а – контрольное растение формирует несколько конкурирующих цветоносных побегов; б – у опытных растений оставлен один главный побег, остальные удалены

Таблица – Количество регенерировавших эксплантов растений с различными фенотипами мужской стерильности на 30-е сутки культивирования

Тип экспланта	Фенотип мужской стерильности				
	Pet X2-1	Pet X4-2	Braun-1	Романс F ₁	Контроль
Гормональные добавки в среду B ₂ N ₂					
Срез узла	5	5	3	8	12
Основание зонтичка	9	7	6	12	15
Срез побега	8	7	7	10	13
Гормональные добавки в среду B ₂ N ₁					
Срез узла	14	12	9	18	15
Основание зонтичка	12	11	10	15	17
Срез побега	14	14	12	18	19
Гормональные добавки в среду B ₂ N _{0,1}					
Срез узла	20	18	15	28	20
Основание зонтичка	21	20	20	29	21
Срез побега	20	17	18	30	22

Примечание. Pet X2-1, Pet X4-2, Braun-1 – названия растений из семей моркови столовой.



Рисунок 3 – Успешный вариант получения пробирочных растений:
 а – первый месяц культивирования на гормональной среде; б – разделенные побеги из (а) высажены для формирования пробирочных растений в среду без гормонов

На среде B_2N_2 наблюдались самые низкие показатели регенерации эксплантов. Равное соотношение концентраций гормонов ингибировало рост тканей узлов, зонтичков и побегов во всех вариантах с мужской стерильностью. Наилучшие по сравнению с остальными образцами показатели роста наблюдались у образца Романс F_1 . Самые низкие результаты были в варианте из образца с braun-типом мужской стерильности – количество регенерантов роста ниже контроля в 2–3 раза.

Понижение концентрации НУК до 1 мг/л по сравнению с концентрацией 2 мг/л повышало регенерационную способность эксплантов в 1,5–2,0 раза. На среде B_2N_1 самое низкое количество регенерантов было в варианте с braun-типом. Образцы Pet X2-1 и Pet X4-2 имели регенеранты у половины количества эксплантов. Лучшие показатели развития регенерантов наблюдались в данном варианте опыта у эксплантов образца Романс F_1 (рис. 3).

При еще более низкой концентрации НУК – 0,1 мг/л наблюдались наилучшие результаты эксперимента: все типы эксплантов независимо от фенотипа увеличивали количество регенерантов от начального количества эксплантов. Способность к регенерации тканей среза побега в образце Романс F_1 повышалась до 30 регенерантов из 30 эксплантов, тканей узлов – до 28 из 30, зонтичков – до 29 регенерантов из 30 эксплантов. Все типы эксплантов данного образца развивали хорошо сформированный побег, готовый к дальнейшему черенкованию (см. рис. 2).

В работе также исследовали ростовые характеристики каллусной культуры моркови столовой с исследуемыми типами мужской стерильности для оценки перспектив создания суспензионной культуры. Каллусная ткань в течение 30 дней культивирования могла быть выделена в дополнение к прямым регенерантам из пробирочной культуры среза главного побега растения на среде $B_2N_{0,1}$. В качестве контроля был получен каллус от фертильного растения моркови столовой сорта Лявониха. Каллусы отбирали из лучших вариантов в четырех повторностях. Максимальная скорость роста каллусной ткани наблюдалась в образце с типом стерильности Романс F_1 – клетки каллуса на

30-е сутки сохранялись гладкими, плотными, ярко-зеленого цвета, а также поддерживали высокий уровень жизнеспособности (кallус увеличивал свои размеры в 4 раза по сравнению с начальной). Размеры кallуса в варианте с петалоидными растениями на 30-е сутки увеличивались в 2 раза. Самый низкий прирост размеров кallуса наблюдали в образце с *brain*-типом мужской стерильности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы установлено, что питательная среда с добавлением БАП в концентрации 2,0 мг/л и НУК – 0,1 мг/л способствует наиболее эффективному процессу прямой регенерации вегетативных побегов в культуре *in vitro* из эксплантов, взятых от побегов 3-го и 4-го порядка, развивающихся в течение цветения экспериментального растения моркови столовой, сформированного в один стебель при постоянном удалении соцветий с ветвей 3-го и 4-го порядка. Наблюдали различную отзывчивость образцов на культивирование *in vitro*. Наилучшей регенерацией побегов характеризовались экспланты с растения из образца Романс F₁ с петалоидным типом мужской стерильности цветка.

Список использованных источников

1. Simon, P. W. Plant breed rev / P. W. Simon, W. C. Matthews, P. A. Roberts. – 2000. – Vol. 19. – P. 157–190.
2. Petaloid male-sterile plants from carrot cell cultures / J. Wright [et al.] // Hortscience. – 1996. – № 31(3). – P. 421–425.
3. Чистова, А. В. Репродукция самонесовместимых линий моркови (*Daucus carota* L.) с использованием культуры тканей / А. В. Чистова, С. Г. Моначос // Изв. ГСХА. – 2014. – Вып. 3. – С. 43–50.
4. Тюкавин, Г. Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови: *Daucus carota* L.: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Г. Б. Тюкавин. – М., 2007. – С. 25–30.
5. Трускинов, Э. В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений / Э. В. Трускинов // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: материалы Междунар. науч. конф., 5–8 июня 2007 г. / Ботанический ин-т им. В. Л. Комарова РАН. – СПб., 2007. – С. 85.
6. Ковальчук, И. Ю. Использование клонального микроразмножения в селекции плодовых и ягодных культур / И. Ю. Ковальчук, М. А. Волгина, А. Х. Насибулина // Ускорение размножения посадочного материала плодово-ягодных культур с использованием биотехнологических методов: сб. науч. тр. – Алма-Ата: КАСХН. – 1991. – С. 6–14.
7. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.

Поступила в редакцию 23 сентября 2019 г.

A. S. Bulakhova, I. V. Pavlova

**DEVELOPMENT OF PETALOID MALE STERILE CARROT
(*DAUCUS CAROTA* L.) PLANT *IN VITRO* CULTURE**

SUMMARY

The effects of hormonal growth regulators contents changes on in vitro culture of carrot with various phenotypes of male sterility are presented. The optimal concentrations of the hormones 6-benzylaminopurin and α -naphthyl-acetic acid, necessary for the direct production of regenerants from sections of the vegetative or generative organs of carrot seed plants, were identified. The most responsive to in vitro cultivation phenotype with the petaloid type of male sterility of the flower was isolated from the Romance F_1 sample.

*Key words: carrot (*Daucus carota* L.), petaloid type of flower male sterility, in vitro culture, 6-benzylaminopurin, α -naphthyl-acetic acid.*