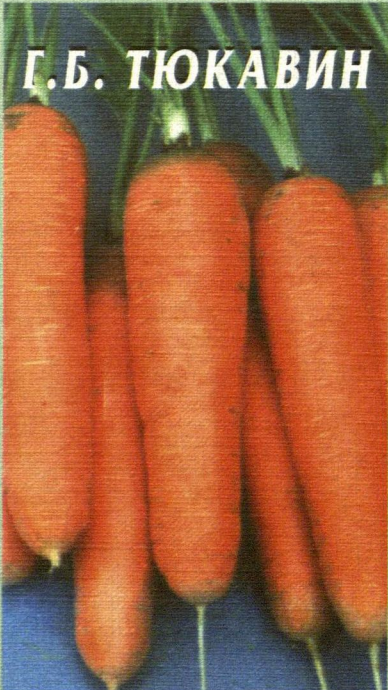
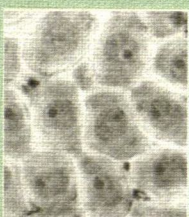


08-536

08-536



ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ МОРКОВИ

МОСКВА
2007

08-00537

Российская академия сельскохозяйственных наук

**Всероссийский научно-исследовательский институт
селекции и семеноводства овощных культур**

Г.Б. ТЮКАВИН

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ МОРКОВИ

**Под общей редакцией и с предисловием
академика РАСХН,
доктора сельскохозяйственных наук, профессора
В.Ф. Пивоварова**



Москва – 2007

УДК 573.66 : 635.132

ББК 41.3 : 42.343

Т 98

Рецензенты:

Доктор сельскохозяйственных наук, профессор *Е.Г. Добруцкая*

Доктор биологических наук *А.В. Поляков*

Тюкавин Г.Б.

Основы биотехнологии моркови: Монография / ВНИИССОК. — М., 2007. — 480 с., цв. илл. — 8 с.

ISBN 978-5-901695-19-7

В монографии рассмотрены методические аспекты стерилизации различных эксплантов, образования каллусных и суспензионных культур, процессов морфогенеза и соматического эмбриогенеза, соматической гибридизации. Особое внимание уделено разработке методов культуры зародышей *in vitro*, андро- и гиногенеза *in vitro*, генетической трансформации. Разработанные биотехнологические методы в сочетании с традиционными методами селекции позволяют ускорить получение оригинальных селекционных форм и гибридов F_1 моркови.

Монография рассчитана на широкий круг биологов, селекционеров, аспирантов и студентов.

Иллюстраций 134, таблиц 108, приложений 8, литература 500 назв.

ISBN 978-5-901695-19-7

© Г.Б. Тюкавин, 2007 г.

© Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, 2007 г.

Russian Academy of Agricultural Sciences

All-Russian Research Institute of
Vegetable Breeding and Seed Production

G.B. TYUKAVIN

CARROT BIOTECHNOLOGY

Under the editorship and the foreword
of the academician RAAS
doctor of agricultural sciences, professor,
V.F. Pivovarov

Moscow – 2007

УДК 573.66 : 635.132

ББК 41.3 : 42.343

Т 98

The reviewers:

The doctor of agricultural sciences, professor *E.G. Dobrutskaya*

The doctor of biological sciences *A.V. Poliakov*

Tyukavin G.B.

Carrot biotechnology: Monography / VNIISOK. — M., 2007. — 480 p., color ill. — 8 p.

ISBN 978-5-901695-19-7

The monography includes the methodical aspects of the various explants sterilization, the formation of callus and suspended cell cultures, the morphogenesis and somatic embryogenesis, as well as the somatic hybridization. The special attention is given to the development of the methods of the embryo culture *in vitro*, andro- and gynogenesis *in vitro*, and the genetic transformation. The developed biotechnological approaches in addition to traditional methods of plant breeding can expedite the producing of the new selection forms and F₁ hybrids of carrot.

This monography is designed for the specialists in the field of biology and agricultural science, post-graduate students and students.

Illustrations 134, tables 108, appendixes 8, references 500.

ISBN 978-5-901695-19-7

© G.B. Tyukavin, 2007

© All-Russian Research Institute of Vegetable
Breeding and Seed Production, 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ХАРАКТЕРИСТИКА МОРКОВИ	9
1.1. История возделывания и эволюция	9
1.2. Ботаническая характеристика моркови – <i>Daucus carota</i> L. ssp. <i>sativus</i> (Hoffm.)	10
1.3. Химический состав	14
1.4. Народнохозяйственное значение	17
1.5. Эмбриологические и кариологические особенности.	20
1.5.1. Цветение.	21
1.5.2. Фертильность пыльцы в соцветиях моркови	25
1.5.3. Микрогаметогенез и макрогаметогенез ..	27
1.5.4. Развитие генеративных органов моркови <i>in vivo</i>	29
1.6. Классические и современные методы в селекции моркови	35
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ В ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ	42
2.1. Основные требования к лаборатории	42
2.2. Выбор и стерилизация эксплантов	43
2.2.1. Общие принципы стерилизации	45
2.2.2. Методические основы стерилизации тканей и органов моркови.	49
2.2.2.1. Стерилизация корнеплодов.	51
2.2.2.2. Стерилизация семян	51
2.2.2.3. Стерилизация завязей	63
2.2.2.4. Стерилизация зонтичков и бутонов	66

2.3. Среды для культивирования	67
2.3.1. Особенности основных компонентов питательных сред для культивирования тканевых культур моркови	68
2.3.1.1. Минеральное питание	68
2.3.1.2. Углеродное питание	70
2.3.1.3. Витамины	71
2.3.1.4. Регуляторы роста	71
2.3.1.5. Растительные экстракты	73
2.3.2. Выбор среды	75
2.3.3. Состав среды	78
2.3.4. Приготовление сред	79
 3. КАЛЛУСНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК <i>IN VITRO</i>	 83
3.1. Индукция, субкультивирование и поддержание каллуса	84
3.1.1. Каллусные культуры различных эксплантов моркови	91
3.1.2. Морфогенез в каллусной культуре	95
3.1.2.1. Гистогенез	95
3.1.2.2. Органогенез	96
3.2. Суспензионные культуры	108
3.2.1. Получение, субкультивирование и поддержание суспензионных культур	109
3.2.2. Соматический эмбриогенез	113
3.2.3. Факторы, определяющие соматический эмбриогенез моркови	121
3.2.3.1. Редуцированный азот	121
3.2.3.2. Другие неорганические источники питания	123
3.2.3.3. Углеводы	123
3.2.3.4. Регуляторы роста	124
3.2.3.5. Факторы среды	126
3.2.4. Синхронизация соматического эмбриогенеза и проблема «искусственных семян»	127
 4. ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	 133
4.1. Соматическая изменчивость	133
4.2. Клеточная селекция	135

5. СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ	139
5.1. Получение протопластов	139
5.2. Слияние протопластов	142
6. КУЛЬТУРА ОПЫЛЕННЫХ ЗАВЯЗЕЙ И СЕМЯПОЧЕК	146
6.1. Оплодотворение и развитие семян	146
6.2. Культура зародышей	152
6.3. Рост и развитие завязей, семязпочек и зародышей <i>in vivo</i>	155
6.4. Влияние различных компонентов среды на рост растений из изолированных зародышей <i>in vitro</i> ...	162
6.5. Регенерация растений <i>in vitro</i> из разновозрастных завязей, семязпочек и зародышей моркови	177
6.6. Апомиксис	187
6.6.1. Получение апомиктических растений моркови <i>in vivo</i>	189
6.6.2. Получение апомиктических растений моркови <i>in vitro</i>	194
7. КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ	197
7.1. Строение пыльника моркови	197
7.2. Развитие пыльника моркови <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> ..	198
7.3. Микроспорогенез и микрогаметогенез у моркови	201
7.4. Взаимосвязь между стадиями развития мужского гаметофита и размерами соцветий и генеративных органов моркови	203
7.5. Условия выращивания донорных растений моркови	212
7.6. Стадии развития микроспор для индукции андрогенных структур моркови	214
7.7. Каллусогенез и эмбриогенез в культуре пыльников моркови <i>in vitro</i>	216
7.7.1. Каллусогенез	218
7.7.2. Эмбриогенез	239
7.8. Способы повышения эффективности калусогенеза и эмбриогенеза в культуре пыльников моркови <i>in vitro</i>	259
7.9. Роль 2,4-Д в индукции андрогенных структур в культуре пыльников моркови <i>in vitro</i>	265

7.10. Цитология эмбриогенеза в культуре пыльников моркови.....	270
7.11. Смена плоидности при формировании растений-регенерантов моркови <i>in vitro</i>	276
7.12. Депонирование.....	280
7.13. Адаптация растений-регенерантов <i>in vivo</i>	283
8. КУЛЬТУРА НЕОПЫЛЕННЫХ ЗАВЯЗЕЙ И СЕМЯПОЧЕК	292
8.1. Взаимосвязь между стадиями развития женского гаметофита и стадиями развития мужского гаметофита, а также размерами соцветий и генеративных органов моркови	292
8.2. Каллусогенез и эмбриогенез в культуре неопыленных завязей и семязпочек моркови <i>in vitro</i>	294
8.3. Цитология каллусо- и эмбриогенеза в культуре неопыленных семязпочек моркови	298
8.4. Смена плоидности при формировании гиногенных растений-регенерантов моркови <i>in vitro</i>	301
9. АНАЛИЗ АНДРОГЕННЫХ И ГИНОГЕННЫХ РАСТЕНИЙ	302
9.1. Растения вегетативного периода онтогенеза ...	302
9.1.1. Андрогенные растения R_{A0}	302
9.1.2. Андрогенные растения R_{A1}	304
9.1.3. Андрогенные растения R_{A2}	310
9.1.4. Гиногенные растения $R_{Г1}$	313
9.2. Растения репродуктивного периода онтогенеза.....	314
9.2.1. Андрогенные растения R_{A0}	314
9.2.2. Гиногенные растения $R_{Г0}$	316
9.3. Прикладное значение метода андрогенеза <i>in vitro</i> у моркови	316
9.4. Сравнительная характеристика андрогенных и гиногенных растений моркови, полученных из сорта Нантская 4	320
9.4.1. Анатомическое строение черешков листьев андрогенных и гиногенных растений моркови R_0 вегетативного периода онтогенеза	322

9.4.2. Молекулярная оценка андрогенных и гиногенных растений моркови R_1 вегетативного периода онтогенеза на основе RAPD технологии	323
9.4.3. Морфологические различия андрогенных и гиногенных растений моркови R_0 репродуктивного периода онтогенеза. . .	326
10. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ	327
10.1. Использование методов прямого переноса генов при генетической трансформации моркови.	337
10.2. Агробактериальная трансформация моркови. . .	338
10.2.1. Трансформация онкогенными штаммами <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . .	338
10.2.2. Трансформация с помощью неонкогенных Ti-плазмидных векторов <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	342
10.3. Генетическая трансформация моркови сорта Нантская 4	349
10.3.1. Трансформация моркови репортерным геном <i>GUS</i>	350
10.3.2. Методика отбора трансгенных растений $R_{T1, \dots, n}$ моркови с селективным геном <i>npt II</i>	352
10.3.3. Отбор и анализ трансгенных растений моркови сорта Нантская 4 с геном растительного дефензина <i>Rs</i>	360
10.3.4. Отбор и анализ трансгенных растений моркови сорта Нантская 4 с геном Тауматин II	365
10.3.4.1. Отбор и анализ трансгенных растений R_{T0}	365
10.3.4.2. Отбор и анализ трансгенных растений R_{T1}	367
10.3.4.3. Отбор и анализ трансгенных растений R_{T2}	376
10.3.4.4. Анализ трансгенных растений R_{T1-T3} на устойчивость к фузариозу (возбудитель <i>Fusarium avenaceum</i>)	380

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	385
СЛОВАРЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ТЕРМИНОВ.....	386
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	395
ПРИЛОЖЕНИЯ	443
Приложение 1. Состав питательных сред, применяемых при культивировании зародышей моркови <i>in vitro</i> на основе МСм (Masuda et al., 1981)	445
Приложение 2. Состав питательных сред, применяемых при культивировании пыльничков моркови <i>in vitro</i>	453
Приложение 3. Состав питательных сред, применяемых при культивировании завязей и семян моркови <i>in vitro</i> на основе МСм (Masuda et al., 1981)	456
Приложение 4. Характеристика проростков моркови, полученных из зрелых зиготических зародышей сорта Московская зимняя А-515 в культуре <i>in vitro</i> (1984 г.)	457
Приложение 5. Авторское свидетельство на сорт моркови столовой Соната	462
Приложение 6. Энергия прорастания и всхожесть семян моркови на фильтровальных мостиках в жидкой среде МСм, содержащей различные концентрации канамицина (1998 г.)	463
Приложение 7. Рост и развитие растений моркови на жидкой среде МСм с канамицином, 0–100 мг/л (1998 г.)	464
Приложение 8. Динамика роста и развития проростков R _{т1} моркови с бинарной системой Тауматин II + <i>npt II</i>	469
ОБ АВТОРЕ	479