

УДК 635.132:573.6
DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-25-30

ПОЛУЧЕНИЕ ДН-РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР МОРКОВИ

PRODUCTION OF DH-PLANTS IN CULTURE OF ISOLATED MICROSPORE IN CARROT



Вюртц Т.С.¹ – м.н.с. лаборатории селекции и семеноводства столовых корнеплодов
Домблидес Е.А.¹ – зав. лабораторией биотехнологии, кандидат с.-х. наук
Шмыкова Н.А.² – начальник отдела ОФР, доктор с.-х. наук, проф. по специальности биотехнология
Федорова М.И.¹ – доктор с.-х. наук, профессор
Кан Л.Ю.¹ – с.н.с. лаборатории генетики и цитологии, кандидат с.-х. наук
Домблидес А.С.¹ – зав. лабораторией генетики и цитологии, кандидат с.-х. наук

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
143072, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: tajtza@yandex.ru, Edomblides@mail.ru
² ООО «Ифар»
634021, Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, д. 79/4
E-mail: shmykovanat@mail.ru

Vjurtts T.S.¹, Junior Researcher, Laboratory of Root Crop Breeding and seed Production
Domblides E.A.¹, Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Biotechnology
Shmykova N.A.², Director of OFR Department, Doctor of Sciences, Professor in Biotechnology
Fedorova M.I.¹, Doctor of Sciences in Agriculture, Professor
Kan L.Ju.¹, Ph.D. in Agriculture, Senior Researcher in Laboratory of Genetics and Cytology
Domblides A.S.¹, Ph.D. in Agriculture, Head of Laboratory of Genetics and Cytology

¹ FSBSI, Federal Scientific Vegetable Centre
Selectionaya St. 14, VNISSOK, Odintsovo region, Moscow oblast, 143072, Russia
E-mail: tajtza@yandex.ru, Edomblides@mail.ru
² LLC Iphar
Elisarovykh St. 79/4, Tomsk, 634021, Russia
E-mail: shmykovanat@mail.ru

Целью данного исследования было изучить факторы, влияющие на процесс эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro*, оптимизировать существующие протоколы и получить удвоенные гаплоиды моркови (ДН-растения). Из 10 изученных в 2017 году сортообразцов нам удалось получить эмбриониды у 8 сортообразцов с использованием 5 различных вариантов питательных сред. Наибольший выход эмбрионидов наблюдался у селекционного образца 7кт (84 эмбриоида на чашку Петри). Было отмечено, что оптимальными для введения в культуру являются бутоны, содержащие преимущественно микроспоры на поздней вакуолизированной стадии развития. Первые деления в культуре микроспор моркови под микроскопом были обнаружены уже через 3 дня после начала культивирования. На 40 сутки эмбриониды были хорошо сформированы и видны невооруженным глазом. Было отмечено, что если продолжать культивировать эмбриониды на питательной среде с 13% сахарозой более 60 суток, то активно начинается процесс образования вторичных эмбрионидов. В связи с этим мы рекомендуем эмбриониды на сердцевидной стадии развития сразу же переносить в отдельные пробирки на регенерационную среду с 2% сахарозой, чтобы вести правильный учет образовавшихся эмбрионидов. Мы провели изучение влияния факторов генотипа и питательной среды, а также их совместного действия на образование эмбрионидов у 8 генотипов моркови на 5 различных питательных средах. Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что генотип является главным фактором определяющим образование эмбрионидов из микроспор, а совместное действие обоих факторов также определяет количество образовавшихся эмбрионидов. Прямым подсчетом числа хромосом в меристематических клетках и с использованием метода подсчета хлоропластов в замыкающих устьичных клетках было установлено, что почти все полученные растения были удвоенными гаплоидами.

Ключевые слова: *Daucus carota* L., ДН-технологии, культура изолированных микроспор, андрогенез, регенерация растений.

Для цитирования: Вюртц Т.С., Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Федорова М.И., Кан Л.Ю., Домблидес А.С. Получение ДН-растений в культуре микроспор моркови. *Овощи России*. 2017;(5):25-30. DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-25-30

The main goals of the research were to study the factors affecting on the process of embryogenesis in culture of isolated microspores, optimize the existing protocols, and finally produce the doubled haploid plants in carrot (DH-plants). Out of 10 carrot accessions tested in 2017 the embyoids were obtained in 8 carrot accessions with the use of 5 different media. The highest yield of embyoids was obtained in accessions 7kt (84 embyoids per Petri dish). It was shown that optimal explants were buds containing microspores at late vacuolated uninucleate stage. The first divisions in microspores were seen in 3 days of cultivation. After 40 days, the well-developed embyoids can be observed by naked eye. It was also shown that further cultivation of these embyoids on medium with 13% agarose over 60 days provoked the active secondary embyoid formation. Owing to this, it is recommended to place the embyoids at heart-shaped stages on another regeneration medium supplied with 2 % of agarose, enabling to register correctly the number of well-formed embyoids. We carried out the study on influence of such factors as genotype and composition of medium, and their combination on embyoid formation in 8 genotypes on 5 various media. ANOVA analysis showed that the plant genotype was the main factor causing the embyoid formation, whereas the effect of both factors had an impact on the number of embyoids developed. The counting the chromosome number in meristem cells and also observation of chloroplast number in stoma guard cells enabled to reveal that most of the plants produced were the doubled haploids

Keywords: *Daucus carota* L., DH-technology, culture of isolated microspores androgenesis, plant regeneration.

For citation: Vjurtts T.S., Domblides E.A., Shmykova N.A., Fedorova M.I., Kan L.Ju., Domblides A.S. Production of DH-plants in culture of isolated microspore in carrot. *Vegetable crops of Russia*. 2017;(5):25-30. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-25-30

Морковь — одна из важных сельскохозяйственных культур. По данным Министерства сельского хозяйства России площадь под промышленным производством моркови столовой в стране достигает ежегодно 23600 га, а потребность в семенах составляет около 40 т. В 2017 году в «Государственном реестре селекцион-

ных достижений, допущенных к использованию», представлено 148 сортов и 143 гибрида F1 моркови столовой.

Корнеплоды моркови широко используются для продовольственных и кормовых целей, в детском и диетическом питании, а также в медицине. В сердцевине моркови обнаружен пигмент апигенин, снимающий усталость

сердечной мышцы (Бунин и др., 2004; Тюкавин, 2007). Из семян моркови производят Даукарин – препарат, который применяется при коронарной недостаточности и стенокардии, и Уролесан, применяемый при мочекаменной и желчекаменной болезни.

Одним из путей повышения урожайности и качества продукции моркови



А. Равное деление – 3 суток культивирования



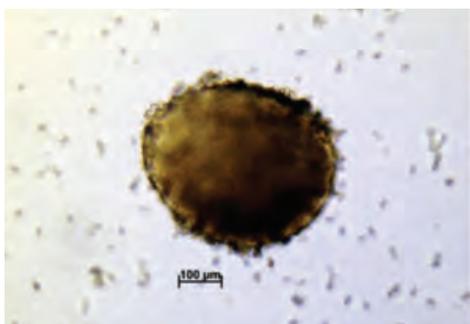
Б. Деления в микроспорах эллипсоидной и сферической формы – 3 суток культивирования



В. Многоклеточные эмбрионидные структуры – 10 суток культивирования



Д. Торпедовидный эмбрионид – 24 сутки культивирования



Г. Глобулярный эмбрионид – 18 суток культивирования



столовой является создание гетерозисных гибридов F₁, отличающихся улучшенными показателями хозяйственно ценных признаков.

Для получения F₁ гибридов моркови необходимы генетически выровненные линии, для создания которых методами классической селекции требуется 12-14 лет. Кроме того, не удается достичь полной степени гомозиготности по желаемым признакам. Это трудоемкий и длительный процесс, который можно сократить с использованием современных биотехнологических методов получения удвоенных гаплоидов *in vitro* (культура пыльников, изолированных микроспор и неоплодотворенных семязачек).

Культура микроспор *in vitro* (андрогагенез) занимает ведущее место в селекционных программах по созданию удвоенных гаплоидных растений (DH-растения). С помощью этого метода можно получить полностью гомозиготные линии за 1 год. Отсутствие соматических тканей в культуре микроспор, позволяет не ставить под сомнение происхождения полученных растений, а реализация гаметоклональной изменчивости в индивидуальных растениях предоставляет возможность получить

большое разнообразие исходного материала для селекции.

Несмотря на многочисленные попытки получить удвоенные гаплоиды в культуре пыльников моркови (Andersen, 1985; Тюкавин и др., 1999; Домблидес 2001; Gyrecka et al., 2005; Шмыкова, 2006; Чистова А.В., 2015), успехи в использовании метода культуры микроспор у этой культуры были достигнуты лишь в последние годы. Matsubara S. et al. (1995) впервые сообщили об образо-

вании многоядерных структур и каллуса в культуре изолированных микроспор. Górczeka K. et al. (2010) и Li J.-R. et al. (2013) впервые получили DH-растения моркови и представили разработанный ими протокол. Однако выход удвоенных гаплоидов у этой культуры остается достаточно низким, и новые генотипы нуждаются в оптимизации данной технологии.

Лаборатория столовых корнеплодов и лаборатория генетики ФГБНУ ФНЦО обладают большой коллекцией перспективных форм моркови столовой для создания гетерозисных гибридов F₁. Целью данного исследования было изучить факторы, влияющие на процесс эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro*, оптимизировать существующие протоколы и получить удвоенные гаплоиды моркови.

Материалы и методы

В работе использовали образцы моркови столовой из коллекции лаборатории столовых корнеплодов и лаборатории генетики и цитологии ФГБНУ ФНЦО, относящиеся к разным сортам (табл. 1). Донорные растения выращивали в условиях открытого грунта с соблюдением агротехнических мероприятий для получения семенников. Корнеплоды, полученные в условиях открытого грунта, после яровизации в холодильной камере при температуре +4-6°C в течение 3 месяцев высаживали в климатической камере при режиме 19°C круглосуточно, 16 ч день/8 ч ночь, освещение 9000 люкс или отопляемой теплице.

При отборе бутонов проводили цитологическое исследование стадий развития микроспор. Для визуализации микроспор и пыльцы использовали методику дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) и микроскоп Axio Imager A2 (Zeiss, Германия), с помощью которого определяли стадию развития микроспор.

Культура микроспор

Бутоны собирали с растений, находящихся на начальной стадии цветения, и стерилизовали 30 с в 96% этаноле, затем в течение 5 мин. в 50% водном растворе коммерческого препарата

Таблица 1. Образцы моркови столовой *Daucus carota* L.

Селекционный №	Название	Происхождение	Сортотип
4	Нантская 4	Россия	Нантская
7	Cubic sperlings	Германия	Флакке
7kt	Селекц. линия	Россия	Флакке
8	Шантенэ	Россия	Шантенэ
9	De Luc	Франция	Шантенэ
10	Purple Dragon	США	Император
19	Nutri-RED	Чехия	Император
22	Rubra Vitamina	Германия	Флакке
23	Saint Valery	Нидерланды	Флакке
26	Maestro F ₁	Франция	Нантская

«Белизна» с добавлением Твина-20 (1 капля на 100 мл), с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Выделение и культивирование микроспор проводили по оптимизированной методике, разработанной для рапса (Lichter, 1982) на среде ½ NLN, pH 5.8 с концентрацией сахарозы 13% и добавлением цефотаксима 200 мг/л. Для индукции эмбриоидов было разработано 4 дополнительных варианта среды на основе NLN и MC (Murashige and Skoog, 1962) с различными добавками.

Культивирование проводили в чашках Петри диаметром 6 см на питательной среде (5 мл), в которой они инкубировались при 32°C в темноте в течение двух суток, далее инкубация проходила при 25°C в темноте до образования эмбриоидов.

Получение растений-регенерантов

Эмбриоиды на торпедо – и сердцевидной стадии развития помещали в стеклянные пробирки с мостиками из фильтровальной бумаги на питательную среду МСм (Masuda et al., 1981) с 2% сахарозой и добавлением 0,1 мг/л кинетина. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 14 часов, освещенности 2,5 тыс. люкс.

Выращивание растений-регенерантов

Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *in vivo*. Выращивали растения-регенеранты в тех же условиях, что и донорные растения.

Определение плоидности растений подсчетом хлоропластов в замыкающих устьичных клетках

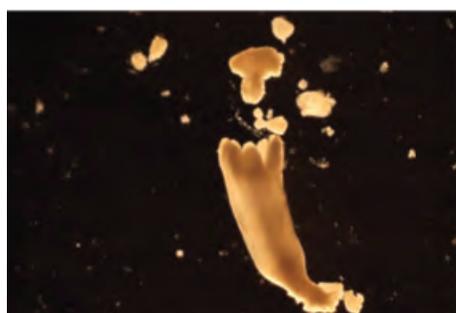
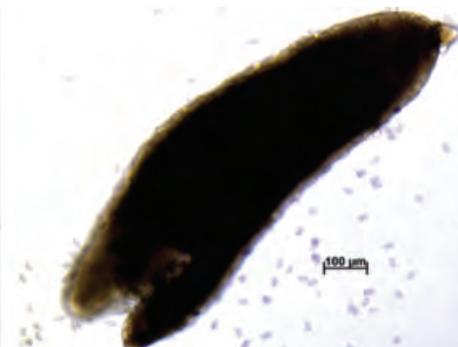
Определение плоидности у растений регенерантов проводили путем подсчета хлоропластов в замыкающих устьичных клетках. Эпидермальный слой клеток снимали с нижней стороны листьев, промывали в дистиллированной воде и помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали сверху покровным стеклом и просматривали под микроскопом Axio Imager A2 с флуоресценцией (набор фильтров BR 490 и 515). Не менее 10 пар устьичных клеток каждого растения были сфотографированы и проведен подсчет хлоропластов.

Подсчет числа хромосом с использованием пропионо-лакмоидного метода

Цитологическое исследование проводили пропионо-лакмоидным методом (Соловьева, 1982) путем приготовления давленных препаратов меристемы стебля и кончиков корней растений, корешков проростков.



Е. Эмбриоиды на 30 сутки культивирования



Ж. Эмбриоиды в культуре микроспор на разных стадиях развития на 45 сутки культивирования
Рисунок 1. Эмбриоиды на разных стадиях развития в культуре микроспор моркови столовой (*Daucus carota* L.)



Рис. 2. Образование аномально развивающихся корневидных эмбриоидов.

Препараты просматривали с помощью микроскопа Zeiss Scope.A1, оснащенного камерой Digital Camera Power Shot G10 Canon. Обработку изображений проводили с помощью программы Axio Vision, версия 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

Статистический анализ

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых математико-статистических методов с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistika 6.0

Результаты

Одним из важных факторов, влияющих на образование эмбриоидов, является стадия развития микроспор. Ранее было определено, что индукция андрогенеза может наблюдаться как на стадии тетрад, так и на стадии вакуолизованных микроспор, но оптимальной для моркови является стадия, когда большая часть микроспор в пыльниках находится на поздней одноядерной стадии (Тюкавин и др., 1999; Домблидес А., 2001; Gorecka K. et al. 2010).

На донорных растениях сорта Шантенэ была проведена серия опытов

Таблица 2. Влияние стадий развития микроспор на образование эмбриоидов*

№ опыта	Стадия развития микроспор и пыльцы в бутонах	Количество чашек, шт	Количество эмбриоидов, шт/ч
1	Тетрады и ранние микроспоры	4	0
2	Одноядерные и преимущественно поздние вакуолизованные микроспоры	4	5±1,4
3	Поздние вакуолизованные микроспоры и двухклеточная пыльца	4	1,25±0,6
4	Двухклеточная и зрелая пыльца	4	0

Примечание:* в эксперименте использовалась среда 1 - S NLN -13, pH 5.8

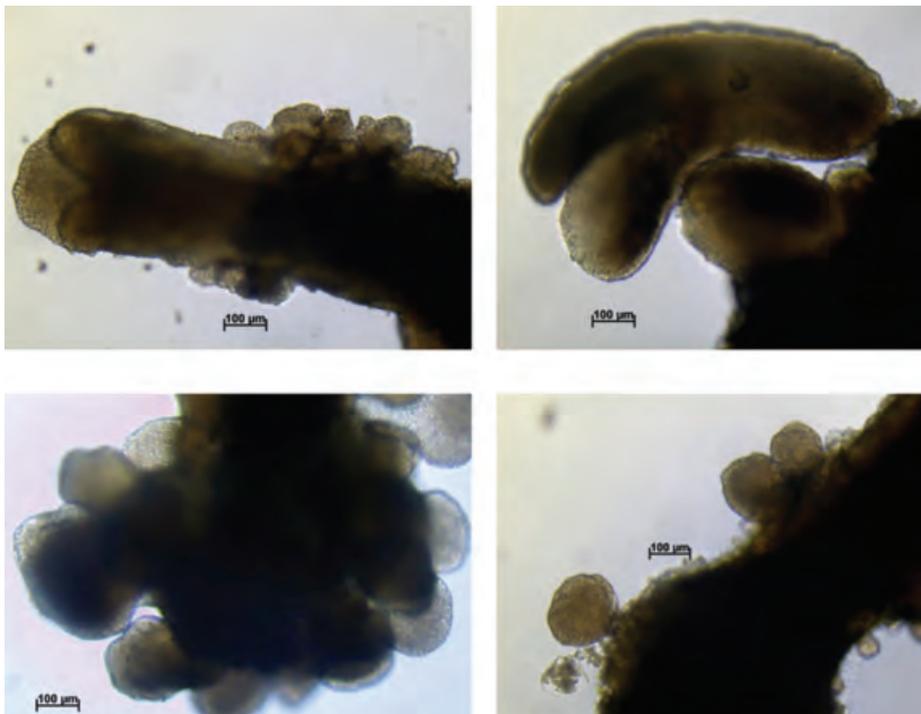


Рис. 3. Образование многочисленных вторичных эмбриоидов на первичных эмбриоидах при длительном культивировании на среде с 13% сахарозой – 70 суток культивирования.

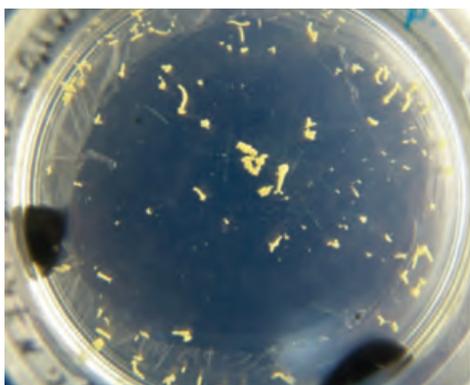


Рис. 4. Эмбриоиды в культуре микроспор на 40сутки культивирования.

по определению оптимальной стадии развития микроспор и пыльцы для индукции эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор моркови. Донорные растения выращивали в защищенном грунте, бутоны срывали с соцветий первого порядка, с зонтичков краевых цветков 1-2 ряда. Закладку опыта проводили каждые 3 дня. Перед введением в культуру *in vitro* для определения стадии развития микроспор препараты окрашивали дифференциальным красителем. В результате этого эксперимента было подтверждено, что наибольший выход эмбриоидов наблюдается у растений моркови, находящихся в начале цветения, из бутонов в которых наибольшая часть микроспор находится на поздней одноядерной стадии развития (табл. 2). Из бутонов, содержащих тетрады и микроспоры на ранней одноядерной стадии развития, а также из бутонов с двухклеточной и зрелой пыльцой эмбриоидов получено не было. Последующие эксперименты на всех образцах проводили, отбирая бутоны только с микроспорами на поздней одноядерной стадии развития.

Нами были цитологически изучены этапы образования эмбриоидов в культуре микроспор моркови (рис 1-4). Первые деления в культуре микроспор моркови под микроскопом были обнаружены уже через 3 дня после начала культивирования, а на 30-45 сутки эмбриоиды были хорошо видны невооруженным глазом. Было отмечено, что если продолжать культивировать эмбриоиды на питательной среде с 13% сахарозой более 60 суток, то активно начинается процесс образования вторичных эмбриоидов (рис. 3) и в последующем это может привести к ложным результатам по увеличенному количеству образовавшихся эмбриоидов за счет вторичного эмбриогенеза. Большая часть эмбриоидов при этом будет генетически идентична. В связи с этим, мы рекомендуем эмбриоиды на сердцевидной стадии развития сразу же переносить в отдельные пробирки на регенерационную среду с 2% сахарозой (рис.5-6), чтобы вести правильный учет образовавшихся эмбриоидов. Поскольку эмбриоиды образуются в культуре микроспор моркови не одновременно и часто находятся на разных стадиях развития, то перенос эмбриоидов на регенерационную среду необходимо проводить несколько раз. Одной из проблем, с которой можно столкнуться при регенерации растений моркови из эмбриоидов, полученных в культуре микроспор *in vitro* – это образование альбиносных или частично альбиносных растений (рис.7). Обычно эта проблема носит генотип-специфический характер. В нашем эксперименте такие растения появлялись в культуре микроспор у сортообразца Шантенэ, где процент альбиносных и частично альбиносных растений составлял около 50%.

Таблица 3. Количество образовавшихся эмбриоидов* на различных вариантах питательной среды**

Сортообразец	кол-во чашек	среда 1	среда2	среда3	среда4	среда5
Cubic sperlings	6	0	13±1,8	10± 2,7	13±1,1	2±0,4
7 кт	6	0	0	0	72 ± 5,4	0
De Luc	6	0	2,4±0,7	0	0	0
Nutri-Red	6	0	4,4±0,7	0	0	0
Rubra Vitamina	6	0	5,5±0,3	0	0	0
Saint Valery	6	4±0,8	0	0	0	0
Нантская 4	6	0	2,2±0,7	0	0	0
Шантенэ	6	5,4±0,5	3,5±0,6	0	0	19±0,9
HCP05		1,3	3,2		7,2	1,3

Примечание: * - среднее количество образовавшихся эмбриоидов в одной чашке Петри на 45 сутки культивирования; **состав питательных сред: среда 1 - S NLN - 13, рН 5.8; среда 2, 3, 4 – на основе среды NLN -13 с различными добавками, рН 5.8, среда 5 – на основе среды – МС с 13% сахарозой, рН 5.8



Рис. 5. Прямое развитие растения R_0 из эмбриоида на мостике из фильтровальной бумаги в прбике на жидкой среде Мсм с 0,1 кинетина.



Рис. 6. Регенерация растений R_0 .



Рис. 7. Альбиносные и частично альбиносные растения моркови сорта Шантенэ.

Для моркови критическим этапом является адаптация растений-регенерантов, 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 увядают. Предположительно это связано с ненормальным функционированием замыкающих клеток устьиц, либо их деформации, а также комплексом метаболических процессов, связанных с водным режимом. При дальнейшем культивировании в условиях *in vivo* у растений-регенерантов формируются новые листья с устьицами, которые нормально развиты (Huguette et al., 1993). Минимизировать эти потери можно,

используя профилактические обработки коммерческим препаратом «Квадрис 250 SC, К.С.», сразу после пересадки и через 2-е суток, затем по мере необходимости. В наших опытах процент гибели растений на этапе адаптации не превышал 20-30% в зависимости от образца.

Полученные растения-регенеранты, успешно прошедшие адаптацию, практически все были удвоенными гаплоидами. Это было подтверждено прямым подсчетом числа хромосом в меристематических клетках (рис.8) и с использованием косвенного метода определения пloidности путем подсчета количества хлоропластов в

замыкающих устьичных клетках (рис. 9). Часть растений – регенерантов R_0 зацветала без прохождения стадии яровизации корнеплодов (рис. 10), основная же часть нуждалась в 2-3 месячной яровизации для успешного получения семян (рис.11).

Известно, что одними из важнейших факторов, влияющих на эффективность эмбриогенеза, является генотип и питательная среда (Тюкавин и др., 1999; Gorecka K. et al. 2010; Чистова А.В., 2015). Из 10 изученных в 2017 году сортообразцов на 5 различных питательных средах нам удалось получить эмбриоиды у 8 сортообразцов (табл. 3). Наибольший

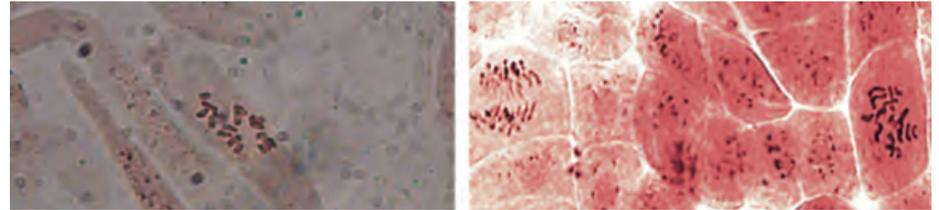


Рис. 8. Хромосомы в меристемных клетках окрашенные с использованием пропион-лактоидного метода (увеличение $\times 100$). А – растение – регенерант R_0 , Б – контрольное диплоидное растение

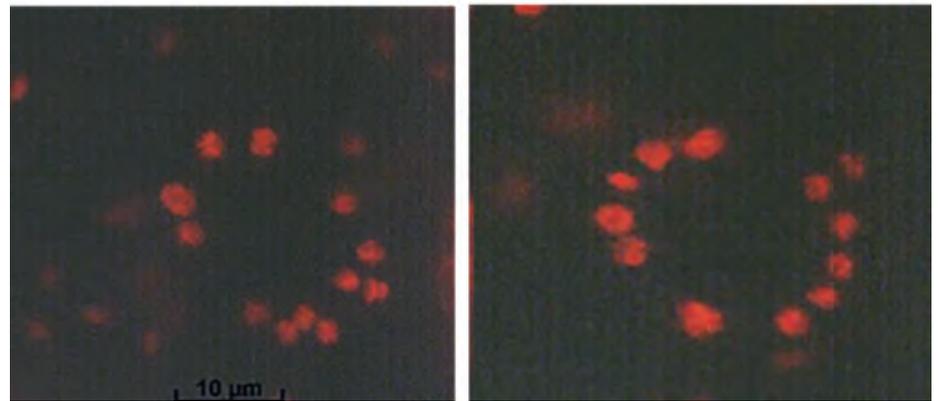


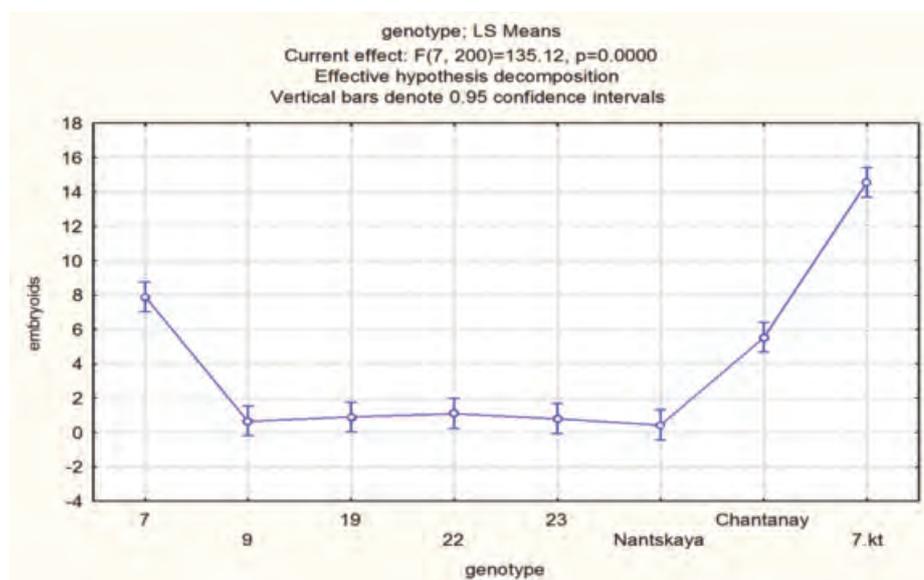
Рис. 9. Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц (увеличение $\times 100$; флюоресценция хлоропластов с использованием набора фильтров BR 490 и 515) А – растение- регенерант R_0 , Б – контрольное диплоидное растение
стемных клетках окрашенные с использованием пропион-лактоидного метода (увеличение $\times 100$). А – растение – регенерант R_0 , Б – контрольное диплоидное растение



Рис. 10. Растения-регенеранты R_0



Рис. 11. Самоопыление растений-регенерантов R_0 в теплице



$HCP_{05}=1,7$

Рис. 12. Образование эмбрионов у различных генотипов моркови.

Таблица 4. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа по влиянию генотипа и состава питательной среды на эффективность образования эмбрионов в культуре изолированных микроспор *in vitro*

Источник вариации	SS	Degr. of	MS	F	p
межгрупповая	3816.04	1	3816.038	663.5625	0.00
генотип	5439.20	7	777.028	135.1157	0.00
среда	3008.11	4	752.027	130.7684	0.00
Взаимодействие генотип*среда	24579.49	28	877.839	152.6455	0.00
случайная	1150.17	200	5.751		

● Литература

1. Бунин М.С., Литвинова М.К., Мешков А.В. Морковь - *Daucus carota* L. (Биологические особенности, селекция и семеноводство, агротехника возделывания). - М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004. – 164 с.
2. Домблидес, А.С. Разработка лабораторной технологии получения гиногенных растений моркови *in vitro*: автореферат дис. к. с.-х.н.М., 2001. 23 с.
3. Тюкавин Г.Б., Шмыкова Н.А., Монахова М.А. Цитология эмбриогенеза в культуре пыльников моркови // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 876-883.
4. Тюкавин, Г.Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови. М., 2007.539 с.
5. 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
6. 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.
7. Соловьёва Л.В. Практикум по цитологии плодовых растений – М.: Изд-во МГУ,1982. – 54 с.
8. Alexander M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. // Stain technol. 1969. V.44. №3. P.117-122
9. Andersen S.B. Anther Culture in Carrot // Hereditas Suppl. 1985. - V.3, N 12.-P. 132.
10. Gyrecka K, Krzyżanowska D, Gyrecki R (2005) The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. J of Appl Genet 46(3):265-269.
11. Gyrecka, 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.
12. Huguette S., Maryse T., Alain C. The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1993. - V.32, N 2. - P. 227-233.
13. 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.
14. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol., 1982, 105: 427-434.
15. Masuda K., Kikuta Y., Okazawa Y. A Revision of the Medium for Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Culture // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 1981. -Vol. 60. - P.—183—193.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
17. 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 Horti, 1995.V. 392. P. 129-137.

● References

1. Bunin M.S., Litvinova M.K., Meshkov A.V. Morkov' - *Daucus carota* L. (Biologicheskie osobennosti, selekciya i semenovodstvo, agrotehnika vzdelyvaniya). - М.: FGNU «Rosinformagrotekh», 2004. – 164 s.
2. Domblides, A.S. Razrabotka laboratornoj tehnologii polucheniya ginogennyh rastenij morkovi in vitro: avtoreferat dis. k. s.-h.n.М., 2001. 23 s.
3. Tyukavin G.B., SHmykova N.A., Monahova M.A. Citologiya ehmbriogeneza v kul'ture pyl'nikov morkovi // Fiziologiya rastenij. 1999. T. 46. № 6. S. 876-883.
4. Tyukavin, G.B. Biotehnologicheskie osnovy selekcionnoj tehnologii morkovi. М., 2007.539 s.
5. CHistova A.V. Sovershenstvovanie in vitro tekhnologii polucheniya udvoennyh gaploidov dlya selekcii F1 gibridov morkovi na osnove samonesovmestimosti: avtoreferat dis. k. s.-h.n., М., 2015. 18 s
6. SHmykova, N.A. Razrabotka sistemy biotehnologicheskikh metodov, napravlennyh na uskorenie selekcionnogo processa ovoshchnykh kul'tur: dis. ... d-ra s-h. Naук: 06.01.05, 03.00.23. - М., 2006.365 s.
7. Solov'yova L.V. Praktikum po citologii plodovyh rastenij – М.: Izd-vo MGU, 1982. – 54 s.

выход эмбрионов наблюдали у селекционного образца 7кт (84 эмбриона на чашку Петри). В своей работе мы провели изучение влияния этих двух факторов и их совместного действия на образование эмбрионов у 8 генотипов моркови на 5 различных питательных средах.

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ (рис.12, табл.4), где генотип и среда являются определяющими факторами, показал, что генотип является главным фактором, определяющим образование эмбрионов из микроспор. В тоже время, совместное действие обоих факторов также определяет количество образовавшихся эмбрионов.

В результате проведенной работы нами были изучены этапы эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro*, изучены факторы, влияющие на эмбриогенез, и получены удвоенные гаплоиды (DH-растения) из 8 сортообразцов моркови столовой. Анализируя отечественный и зарубежный опыт, прослеживается перспективность разработок DH-технологий получения удвоенных гаплоидов у растений моркови столовой через культуру изолированных микроспор *in vitro*. Внедрение этой технологии позволит ускорить процесс создания конкурентно способных гибридов моркови.