УДК 573.66:631.52:635.132

СИСТЕМА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В СЕЛЕКЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ МОРКОВИ (Daucus carota L.)

Тюкавин Г.Б.

ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур
Россия, 143080, Московская область, п. ВНИИССОК, тел.(495)599-24-42
E-mail: vniissok@mail.ru

Разработана система биотехнологических методов для селекционной технологии моркови, включающая: способы стерилизации исходных эксплантов; регенерационную систему из каллусов; культуру зиготических зародышей; культуру неопыленных семяпочек; культуру пыльников и генетическую трансформацию. Теоретические разработки были использованы при получении сорта моркови столовой Соната, перспективных гибридов F_1 и трансгенных семей с повышенной устойчивостью к Fusarium avenaceum.

Ключевые слова: морковь, гаплоиды, андрогенез, гиногенез, экспланты, зиготические зародыши, трансгеноз.

Морковь служила одним из важнейших модельных объектов при изучении фундаментальных вопросов физиологии и генетики культивируемых клеток и тканей растений, которые, в свою очередь, способствовали пониманию процессов, происходящих на уровне организма. При изучении морфогенеза в каллусных культурах моркови была установлена двухфазность органогенеза и обоснована гипотеза о том, что направление морфогенеза определяется концентрацией и соотношением внесенных в среду стимуляторов роста ауксиновой и цитокининовой природы (Бутенко, 1964). Суспензионная культура моркови позволила вскрыть механизмы образования и развития зародышей в культуре *in vitro*, что было трудно, а порой и невозможно, сделать при изучении эмбриогенеза *in vivo* (Ammirato, 1986). В прикладном отношении использование методов биотехнологии растений ограничивалось возможностью использования соматического эмбриогенеза для размножения родительских инбредных линий и отбора *in vitro* для получения новых источников устойчивости к болезням (Meredith, Lawrence, 1981). Использование соматического эмбриогенеза позволило разработать технологию производства искусственных семян, что открыло новый путь к сохранению и поддержанию ценных селекционных линий (Kitto, Janick, 1985; Kamada et al., 1989; Liu et al., 1992). Нерешенными оставались вопросы культуры зародышей, завязей и семяпочек, пыльников *in vitro* и получения трансгенных растений моркови с новыми хозяйственно полезными признаками. Решению этих вопросов были посвящены исследования, проводимые во ВНИИССОК с 1983 года.

В результате проведенных исследований разработан ряд основополагающих биотехнологических методов, использование которых позволяет получать за короткое время исходный материал для селекции моркови с нужными для селекционера признаками.

Важным условием при разработке биотехнологических методов является выбор исходного экспланта и его стерилизация. Из литературных источников следовало, что для стерилизации различных эксплантов моркови (корнеплоды, семена) использовали 0,1% раствор сулемы (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980), 0,4% раствор гипохлорита Na (Masuda et al., 1981) и этанол (Плащев, 1982). В наших исследованиях был изучен широкий спектр стерилизующих веществ, в результате чего были предложены следующие способы стерилизации различных эксплантов моркови.

1. Для получения стерильной культуры зародышей; а) из семян – предварительная стерилизация 96% этанолом в течение двух минут, а затем стерилизация 0,5% водным раствором сулемы в течение 20-30 минут; б) из завязей – предварительная стерилизация 96 % этанолом в течение 1 минуты, а затем стерилизация 0,1% водным раствором сулемы в течение 20-30 минут. Прорастание выделенных зародышей моркови на питательных средах в условиях *in vitro* составило в среднем 83,2 ±1,5% при доверительном интервале 80,2-86,0%. Существенных морфологических изменений у растений, полученных в условиях *in vitro*, не отмечалось.

2. Для получения стерильной культуры пыльников и семяпочек стерилизация зонтичков и/или бутонов 10% водным раствором хлорамина «Б» в течение 20-30 мин. Для стерилизации бутонов весьма эффективным способом является обработка их 0,5% водным раствором сулемы.

Последнее время для стерилизации эксплантов нами используются шприцы. На наш взгляд при этом достигается ряд преимуществ:

а) снижается расход стерилизующих растворов;

б) обеспечивается максимальное смачивание эксплантов;

в) происходит лучшая промывка эксплантов.

Ключевым моментом практической ре-

ализации решения тех или иных задач в селекционно-генетических исследованиях с использованием методов биотехнологии растений является разработка систем регенерации целых растений из отдельных клеток и/или их групп, а также различных органов.

В ранних исследованиях по изучению органогенеза в каллусных тканях моркови было показано, что переход ткани к образованию корней, а затем почек наблюдался после переноса ткани со среды с ИУК или аденином на среду без добавления активных веществ. Органогенезу предшествовало появление определенного градиента в активности ауксиноксидазы между верхней частью ткани и нижней. В верхней части активность ауксиноксидазы была значительно выше, и именно здесь наблюдалось образование стеблевых почек (Pilet, 1961).

Более детально и целенаправленно исследования по органогенезу в культуре каллусных тканей моркови были проведены в ИФР. Наиболее интересным обстоятельством этих исследований явилось установление факта фазности процесса органогенеза. Первая фаза органогенеза – переход недифференцированно растущей ткани к образованию регенерационной меристемы и закладке «зародышеподобных» структур – происходит под влиянием добавления к питательной среде производных нуклеинового обмена и аминокислот. Эта фаза может быть названа фазой меристематизации и дифференциации зачатков органов. Вторая фаза органогенеза – переход возникших образований к активному росту стеблевых органов и корней – происходит у моркови при введении в питательную среду антиметаболитов нуклеиново-белкового обмена или ауксинов (Бутенко, 1964). В настоящее время для индукции каллуса из корнеплодов используют среду МС с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л кинетина. Для индукции стеблевого органогенеза используют среду МС, содержащую 0,2 мг/л БАП (Калашникова, 1996).

Для индукции каллуса и последующего получения растений в качестве эксплантов также используются гипокотили проростков (Masuda et al., 1981; Šimková, 1998; Ипатова, 2004) и сегменты листовых черешков (Ипатова, 2004).

В наших исследованиях каллусные культуры получали из зиготических зародышей моркови на основной среде МСм (Masuda et al., 1981) В результате была разработана регенерационная система, заключающаяся в следующем:

1 – индукция каллуса проводится на среде МСм с 0,2 мг/л 2,4-Д;
2 – регенерация проростков из каллусов – на среде МСм с 0,1 мг/л кинетина;
3 – подращивание и укоренение растений-регенерантов моркови – на фильтровальных мостиках в жидкой среде МСм без гормонов или с добавлением 0,1 мг/л кинетина.

Разработанная нами регенерационная система была с успехом использована при генетической трансформации моркови репортерным геном GUS, геном растительного дефензина из семян редьки Rs и геном Тауматин II (Шушкова и др.,1998), а также геном итерлейкина-18 человека (Дейнеко и др., 2004).

Культура изолированных зиготических зародышей широко используется у различных культур для решения ряда генетико-селекционных задач. Основными из них являются: 1 – управление первыми этапами онтогенеза – эмбриогенеза (например, использование генетического признака – автономности); 2 – сокращение и снятие периода покоя семян; 3 – создание банка растительных тканей ценных видов растений; 4 – преодоление нескрещиваемости при прогамной и постгамной несовместимости; 5 – получение апомиктичных растений и т.д.

Исследования по культуре зиготических зародышей моркови *in vitro* не проводились. В этом плане наши исследования являются оригинальными. В результате исследований был разработан состав питательной среды, позволяющий получать растения из изолированных зародышей на разных стадиях развития. Установлено, что пороговым сроком отделения завязей от материнского растения для культивирования завязей, семяпочек и зародышей *in vitro* является четыре недели после опыления. К этому времени зародыш достигает 1/3-1/2 своего окончательного размера *in vivo*. Разработанные методические приемы были использованы для культивирования апомиктичных зародышей. В результате было получено 30 линий, две из которых были отобраны как перспективные формы для селекции (Тюкавин др., 1988).

Культура зиготических зародышей моркови *in vitro* может быть также использована для получения межвидовых и межродовых гибридов в тех случаях, когда гибридные зародыши полностью не развиваются на материнском растении, и требуется их доращивание и получение растений в условиях *in vitro*.

Гаплоидия – одно из важнейших прикладных направлений генетики и селекции. Путем удвоения числа хромосом у гаплоидов можно сразу создать гомозиготные линии, на выделение которых при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур приходится затрачивать до 7-10 лет (однолетние растения) и/или 14-20 лет (двулетние растения). Экспериментально гаплоидные растения можно получить разными методами: 1 – отбор близнецов; 2 – межвидовые скрещивания; 3 – радиологический метод; 4 – гибридизация на разных уровнях плоидности. В последнее время для этой цели широко используются методы биотехнологии растений, а именно андрогенез и гиногенез *in vitro*.

Морковь имеет довольно мелкие генеративные органы и в начале 80-х годов XX века высказывалось скептическое мнение о возможности получения гаплоидов с использованием метода андрогенеза *in vitro* (Sung, Dudits, 1981). Тем не менее, с 1983 года нами были начаты исследования в этом направлении. Разработка современных методов для ускоренного создания гомозиготных линий является весьма актуальной задачей в селекции моркови (Stein, Nothnagel, 1995; Simon, 1997). Разработкой метода андрогенеза *in vitro* для моркови занимались исследователи Дании (Andresen et al., 1990), Японии (Hu et al., 1993) и Польши (Górecka, Krzyżanowska, 2001). В этих исследованиях для индукции андрогенных структур использовалась основная среда Б5 с высоким содержанием сахарозы 10-14 г/л и низким содержанием фитогормонов (Andresen et al., 1990; Górecka, Krzyżanowska, 2001) и основная среда МС с высоким содержанием ауксинов (Hu et al., 1993). Кроме того, в этих работах не отражены вопросы цитоэмбриологии образования андрогенных структур и не дается оценка полученных андрогенных растений современными методами молекулярного анализа. Также проблематичным остается вопрос адаптации андрогенных растений-регенерантов (Górecki et al., 2001).

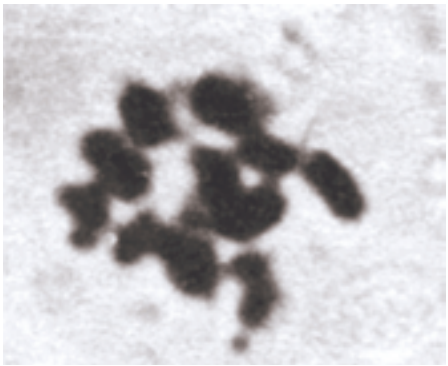
В наших исследованиях изучены все аспекты метода андрогенеза *in vitro* и разработана технология получения удвоенных гаплоидов моркови.

Было установлено, что пыльники моркови являются гормонозависимыми. Первичными эксплантами служат бутоны, в пыльниках которых содержатся одноядерные микроспоры, находящиеся на стадии развития, предшествующей их поляризации, и на начальной стадии поляризации. Выращивание донорных растений следует проводить в контролируемых условиях, что является залогом воспроизводимости результатов экспериментов.

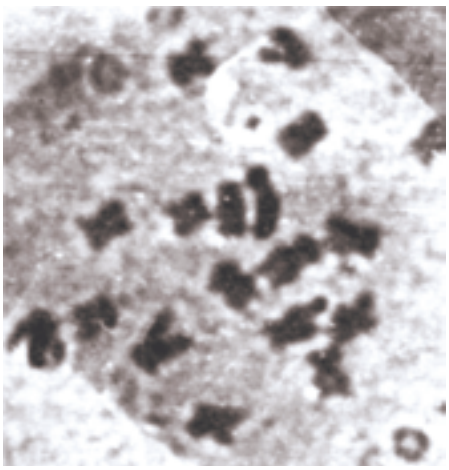
Цитоэмбриологическими исследованиями установлено, что развитие андрогенных структур происходит как при равном, так и при неравном делении микроспор. При равном делении микроспор закладку проэмбрио отмечали как в обеих клетках, так и в одной. В последнем случае вторая клетка не развивалась. При неравном делении микроспор, когда в результате митоза образуются генеративная и вегетативная клетки, но размеры первой больше обычных, возможны три пути образования эмбриоидов:

1. Эмбриоиды развиваются из вегетативной клетки; генеративная клетка при этом деградирует.

2. Эмбриоиды развиваются из генеративной клетки; развитие вегетативной клетки при этом подавлено.
3. Одновременное развитие эмбриоидов из вегетативной и генеративной клеток; генеративная клетка отличается меньшими размерами по сравнению с вегетативной. В процессе вторичного эмбриогенеза и регенерации растений в системе *in vitro* происходит смена плоидности от n до 2n (рис. 1).



А



А

Рис. 1. А - гаплоидная метафаза (n=9) и Б - диплоидная (2n=18) метафазы в меристеме клеток корня растений-регенерантов моркови R_0 (x 90)

Технология получения андрогенных растений-регенерантов в культуре пыльников моркови заключается в следующем:

1 – стерилизацию бутонов моркови проводят 10% водным раствором хлорамина «Б» в течение 20-30 мин или 0,5% водным раствором сулемы с добавлением к нему в качестве эмульгатора твин-20 (Serva, США) в количестве 1 капля на 100 мл раствора в течение 20 мин;
2 – бутоны в течение 2-4 недель культивируют в темноте (в термостате при 25°С) на агаризованной среде МСм с 0,2 мг/л 2,4-Д;
3 – разросшиеся пыльники выделяют из бутонов, переносят в пробирки на свежую среду того же состава и культивируют на этажерочной светоустановке с люминесцентными лампами при освещенности 2-3 клк, фотопериоде 16 ч и температуре 20...25°С до образования эмбриоидов и/или эмбриогенного каллуса (5-6 нед);
4 – эмбриоиды и/или эмбриогенный каллус переносят на фильтровальные мостики в стеклянные пробирки с жидкой средой МСм, содержащей 0,1 мг/л кинетина, где начинается процесс образования проростков либо из первичных, либо из вторичных эмбриоидов;
5 – подращивание и укоренение растений-регенерантов проводят на фильтровальных мостиках в стеклянных пробирках с жидкой безгормональной средой МСм;
6 – для адаптации *in vivo* растения-регенеранты моркови высаживают в торфяные или пластмассовые горшочки с почвосмесью и накрывают слегка перфорированными полиэтиленовыми пакетами или стеклянными (пластиковыми) стаканчиками. Период адаптации составляет 3-4 недели. Далее растения R_{A0} хорошо развиваются в типичных условиях выращивания защищенного и/или открытого грунта.
7 – хранение и яровизация корнеплодов R_{A0} осуществляют в обычных условиях;
8 – во время цветения растений R_0 проводят самоопыление каждого андрогенного растения в отдельности;
9 – из полученных семян выращивают растения R_{A1} и проводят молекулярно-генетический анализ;
10 – отобранные дигаплоидные линии в последующем используют в селекционных программах по получению сортов и F_1 гетерозисных гибридов моркови.

Разработанная нами технология получения удвоенных гаплоидов позволяет получать генетически выровненный исходный материал для селекции F_1 гетерозисных гибридов моркови за 2-3 года. Технология легко воспроизводима. Эффективность данной технологии подтверждена с использованием RAPD-технологии, основанной на амплификации геномной ДНК (Дорохов и др., 1996; Лаптева, 1999; Тюкавин и др., 2001).

Использование метода андрогенеза *in vitro* моркови позволило получить исходный материал, который был использован при создании сорта моркови столовой Соната (рис.2; табл.1) и получении гибридов F_1 во ВНИИО (Семенова и др., 2003).

Рис. 2. Схема получения сорта моркови столовой Соната

Семья № 46

X

Семья № 77

1. Хозяйственные и биологические показатели нового сорта моркови столовой Соната в сравнении со стандартом – сортом Нантская 4 (Тюкавин и др., 2005; Тюкавин 2007а, 2007б)

Показатель	Сорт		+/- к к стандарту
	Нантская 4	Соната	
Ранняя урожайность корнеплодов, т/га	37,30	36,90	- 0,40
Общая урожайность корнеплодов, т/га	72,23	78,70	+ 6,47
Урожайность товарных, хозяйственно годных корнеплодов, т/га	48,23	56,87	+ 8,64
Масса товарного корнеплода, г	71,27	89,63	+ 18,36
Урожайность семян с одного растения, г	27,00	30,05	+ 3,05
Развитие бактериоза на искусственном инфекционном фоне, %	68,60	54,30	* - 14,30
Развитие бактериоза на естественном инфекционном фоне, %	63,80	47,77	* -16,03
Вкусовая оценка корнеплодов, балл	3,85	4,85	* +1,00
Содержание сухого вещества в корнеплодах, %	10,74	12,59	* + 1,85
Сумма сахаров, %	6,64	8,62	* + 1,98
Каротин, %	12,15	18,48	* + 6,33
Содержание нитратов, мг/кг	178,18	143,37	- 34,81

Примечание: * Указывает статистически значимые различия при НСР$_{05}$.

Культура неоплодотворенных завязей и семяпочек (гиногенез *in vitro*) является альтернативным методом получения гаплоидов и/или удвоенных гаплоидов по сравнению с культурой пыльников. Несмотря на то, что этот метод широко используется у ряда важных сельскохозяйственных культур, в доступной нам литературе о разработке этого метода у моркови нет никакой информации.

В процессе наших исследований, проводимых с 1988 года, был разработан метод гиногенеза *in vitro* для моркови с использованием неопыленных завязей и семяпочек. Было установлено, что женские генеративные органы так же, как и пыльники, являются гормонозависимыми. Первичными эксплантами служат бутоны, в которых семяпочки содержат семиклеточный или зрелый зародышевый мешок. Стадию развития зародышевого мешка можно определить по стадии развития микроспор или по размерам завязи.

Разработанная нами технология получения гиногенных растений в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* заключается в следующем:

1 – бутоны в течение двух недель культивируют в темноте (в термостате при 25 С) на агаризованной среде МСм с 0,2 мг/л 2,4-Д;

2 – из разросшихся завязей выделяют семяпочки и помещают на среду МСм с 0,2 мг/л 2,4-Д и культивируют до образования эмбриоидов (рис. 3) и/или эмбриогенного каллуса которые, как правило, образуются у микропилярного конца семяпочек.

Последующие элементы технологий аналогичны с технологией для андрогенеза *in vitro* моркови.

Эффективность данной технологии подтверждена с использованием RAPD-технологии, основанной на амплификации геномной ДНК (Лаптева, 1999; Тюкавин и др., 2001).

С использованием метода гиногенеза был получен исходный материал для создания гибридов F_1 во ВНИИО (Семенова и др., 2003)

Одним из приоритетных направлений современной биотехнологии растений является создание трансгенных растений. Хотя ведущими трансгенными культурами в мировом масштабе являются трансгенные соя, кукуруза, рапс и хлопчатник (ISAAA, 2004), с каждым годом растет и число испытаний овощных культур. К 2003 году общее количество полевых испытаний трансгенных овощных культур превысило 1200. Более 50% из них приходилось на томаты и только 1,3 % – на морковь.

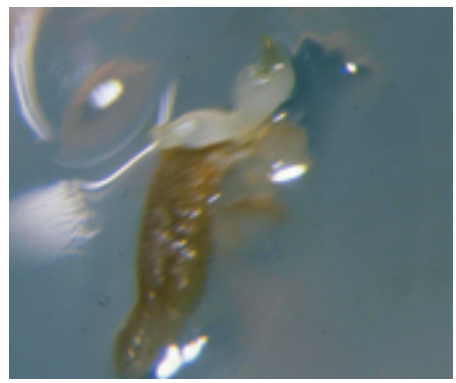


Рис. 3. Образование эмбриоидов в культуре неопыленных семяпочек моркови (гиногенез in vitro).

По моркови в период с 1993 по 2004 годы было проведено 17 полевых испытаний трансгенных форм. В первую очередь испытывали формы с повышенной устойчивостью к фитопатогенам (11 испытаний), 4 испытания проводили с формами, обладающими улучшенным качеством урожая и с 1999 года начаты полевые испытания трансгенных растений моркови, устойчивых к гербицидам.

Во второй половине 90-х годов XX века голландской фирмой Mogen на рынок были предложены трансгенные формы моркови с повышенной устойчивостью к грибным фитопатогенам Alternaria, Cercospora и Erysiphe. Повышенная ус-

тойчивость к грибным фитопатогенам позволяет проводить механизированную уборку урожая.

В наших исследованиях была проведена модификация метода бактериальной трансформации моркови. В результате исследований было установлено, что лучшим вариантом для совместного культивирования агробактерий и каллуса моркови является использование фильтровальной бумаги для «подсушивания» и последующего культивирования. Установлено так же, что для трансформации каллусов моркови необходимо совместное культивирование их с агробактериями в течение 2-3 суток (Шушкова и др., 1998).

Разработана методика отбора трансгенных растений RT1, ..., n моркови с селективным геном npt II, суть которой заключается в следующем: семена стерилизуют коммерческим препаратом «Белизна» в течение 20-30 мин; помещают на фильтровальные мостики в стеклянные пробирки (21 200 мм) с жидкой безгормональной средой МСм (Masuda et al., 1981), содержащей канамицин в концентрации 100 мг/л; проращивание семян и выращивание растений проводят на свету; отбор растений проводят через четыре недели; растения, имеющие 2-3 настоящих листа и хорошо развитую корневую систему, высаживают в вазоны с почвой для адаптации *in vivo*; в течение 2-3 недель растения выдерживают при повышенной влажности воздуха (для этого растения закрываются перфорированными пластиковыми пакетами или стаканчиками); после адаптации проводится молекулярно-биологический анализ включения и экспрессии генов.

В результате исследований впервые получены трансгенные растения (аналоги сорта Нантская 4) с геном Тауматин II, устойчивые к Fusarium avenaceum.

Таким образом, во ВНИИССОК разработан ряд современных биотехнологических методов, направленных на ускоренное получение исходного селекционного материала моркови с заданными признаками.

Литература

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

Дейнеко Е.В., Филипенко М.Л., Храпов Е.А., Загорская А.А., Филипенко Е.А, Тюкавин Г.Б, Шмыкова Н.А., Сенников С.В., Шумный В.К. Создание трансгенных растений табака и моркови с геном интерлейкина-18 человека // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Тез. докл. III международной научной конференции 19 октября 2004. – Москва, 2004. – С. 130-131.

Дорохов Д.Б., Тюкавин Г.Б., Лаптева М.Н., Помозглова Г.Е., Соханова Н.М., Литвиненко М.В. Морфологическая, биохимическая и молекулярная оценка андрогенных растений моркови // Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Тез. конф. – М., 1996. – С. 24.

Ипатова Н.В. Оценка исходного материала столовой моркови на устойчивость к фузариозу и альтернариозу с использованием методов традиционной и клеточной селекции: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 2004 – 21 с.

Калашникова Е.А. Клеточная инженерия // Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии. – М., – 1996. – С. 3- 57.

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.

Лаптева М.Н. Разработка методов молекулярной оценки селекционного материала основных овощных культур (лук, морковь, капуста белокочанная) на основе RAPD технологии: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 1999. – 25 с.

Плащев В.М. Действие нистатина на внутреннюю инфекцию семян моркови // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции ВНИИ растениеводства. – 1982. – Т.71, Вып. 3. – С. 145-146.

Семенова В.А., Тюкавин Г.Б., Клыгина Т.Э. Морфологическая характеристика гиногенных и андрогенных растений моркови // Селекция, семеноводство и биотехнологии овощных и бахчевых культур: Докл. III Междунар. конф. посв. памяти Б.В. Квасникова. – М., 2003. – С. 404-408.

Тюкавин Г.Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови (Daucus carota L.): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2007а. – 50 с.

Тюкавин Г.Б. Основы биотехнологии моркови: Монография / ВНИИССОК. – М., 2007б. – 480 с., цв. илл. – 8 с.

Тюкавин Г.Б., Рыбалко А.А., Шмыкова Н.А., Селянин И.Г. Андрогенез *in vitro* – метод ускоренного получения сорта столовой моркови Соната // Состояние и проблемы научного обеспечения овощеводства защищенного грунта: Материалы II Междунар. науч. конф. 21-23 ноября 2005 г. – М., 2005. – С. 144-147.

Тюкавин Г.Б., Супрунова Т.П., Шмыкова Н.А., Домблидес А.С., Дорохов Д.Б., Клыгина Т.Э. Изучение гаметоклональной изменчивости у моркови сорта Нантская 4 // Овощеводство – состояние, проблемы перспективы: Научные труды (к 70-летию ВНИИО) В 2 т.. – М., 2001. – Т.1. – С. 157-161.

Тюкавин Г.Б., Тимин Н.И., Валеева З.Т., Буракова И.А. Эмбриокультура в создании константных линий моркови // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез. докл. Междунар. конф., 2-6 авг. 1988. – Новосибирск, 1988. – Ч. 2. – С. 239-240.

Шушкова Т.В., Тюкавин Г.Б., Долгов С.В. Генетическая трансформация моркови (Daucus carota L.) // Новые направления биотехнологии: Тез. докл. VIII конф. 27 – 29 апреля 1998. – М., 1998а. – С. 34.

Ammirato P.V. Carrot // Handbook of plant cell culture / Eds D.A. Evans et al. – New York: Macmillan, 1986. – V.4. – P. 457-499.

Andersen S.B., Christiansen J., Farestveit D. Carrot (Daucus carota L.): *In vitro* production of haploids and field trials // Biotechnology in agriculture and forestry: Haploids in crop improvement / Ed. Y.P.S. Bajaj – Berlin Heidelberg.: Springer-Verlag, 1990. – V.12. – P. 393-402.

Gȯrecka, Krzyżanowska D. The use androgenesis *in vitro* to obtain homozygous lines of vegetable plants // Vegetable Crops Bull. – 2001. – V.54. – P. 7-11.

Gȯrecki R., Gȯrecka, Krzyżanowska D., Kozik E., Nowak R., Adasik B. Rooting and adaptation of androgenic carrot plants // Vegetable Crops Bull. – 2001. – V.54. – P. 25-28.

Hu K.L., Matsubara S., Murakami K. Haploid plant production by anther culture in carrot (Daucus carota L.) // J. Japan Soc. Hort. Sci. – 1993. – V.62, N 3. – P. 561-565.

Kamada H., Kobayashi K., Kiyosue T., Harada H. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its applications to synthetic seed production // *In vitro* Cell Div. Biol. – 1989. – V.25. – P. 1163-1168.

Kitto S.L., Janick J. Production of synthetic seeds by encapsulating embryos of carrot // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 1985. – V.110. – P. 277-282.

Liu J.R., Jeon J.H., Yang S.G., Lee H.S., Song N.M., Jeong W.J. Dry type of carrot (Daucus carota L.) artificial seeds // Scientia Horticulture. – 1992. – V.51. – P. 1-11.

Masuda K., Kikuta Y., Okazava Y. A. Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. – 1981. – V.60. – P. 183-193.

Meredith C.P., Lawrence R.H. Report of the vegetable crops round-table // Environ and Exp. Bot. – 1981. – V.21, N 3-4. – P. 401-405.

Pilet P.E. Auxins and the process of aging in root cells // Plant growth regulation / 4th Internet. Conf. – Iowa, Univ. Press, 1961. – P. 167-179.

Šimková H. Methylation of mitochondrial DNA in carrot (Daucus carota L.) // Plant Cell Reports. – 1998. – V.17. – P. 220-224.

Simon P.W. Improvement of carrots for U.S. production with classical and modern techniques // J. Appl. Genet. – 1997. – 38A. – P. 1-4.

Stein M., Nothnagel T. Some remarks on carrot breeding (Daucus carota sativus Hoffm.) // Plant Breed. – 1995. – V.114. N 1. – P. 1-11.

Sung Z.R., Dudits D. Carrot Somatic Cell Genetics // Genetic engineering in the plant sciences / Ed. N.J. Panopoulos – N. Y., 1981. – P. 11-37.