

Алжарамани Насим

**ПОИСК ИСТОЧНИКОВ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ И РАЗРАБОТКА
МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОРКОВИ
(*D. CAROTA L.*)**

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство
и биотехнология растений

АФТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Монахос Сократ Григорьевич,**
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
зав. кафедрой молекулярной селекции, клеточных
технологий и семеноводства ФГБОУ ВО
«Российский государственный аграрный
университет–МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Домблидес Артур Сергеевич,**
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
зав. лабораторией генетики и цитологии ФГБНУ
«Федеральный научный центр овощеводства»

Курина Анастасия Борисовна,
кандидат сельскохозяйственных наук, младший
научный сотрудник, куратор коллекции
малораспространенных культур отдела
генетических ресурсов овощных и бахчевых
культур, ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений им. Н.И.
Вавилова»

Ведущая организация ФГБНУ Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии»

Защита состоится «22» декабря 2025 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Е.А. Вертикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Морковь (*Daucus carota* L.) с хромосомным набором $2n=2x=18$, занимает одно из ведущих мест среди выращиваемых во всем мире корнеплодов и имеет существенное экономическое значение (Mulugeta et al., 2025). Морковь часто используется в биотехнологических исследованиях в качестве модельного объекта, а методы культивирования *in vitro* открывают новые возможности для совершенствования культуры (Алжарамани и Монахос, 2025; Que et al., 2019).

В селекции моркови создание гибридов (F1) осуществляется на основе ядерно-цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) (Farinati et al., 2023; Broussard et al., 2017) с достаточно сложным генетическим контролем и подверженностью факторов среды. Создание аллоплазматической истинной цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) у *D. carota*, неподверженной факторам среды и восстановлению фертильности за счет влияния ядерных генов, может стать существенным достижением в селекции моркови, облегчающим генетико-селекционную схему создания F1-гибридов. Потенциально метод слияния протопластов может позволить внедрить чужеродные цитоплазматические геномы в ядерный фон моркови (Bruznican et al., 2021; Xu et al., 2022) и индуцировать мужскую стерильность, независимую от линий закрепителей стерильности, что позволит устранить основное ограничение традиционных систем ядерно-цитоплазматической мужской стерильности, при которых восстановление фертильности и расщепление снижают эффективность селекции (Thakur et al., 2020; Chugh et al., 2020; Thi et al., 2023).

Степень разработанности темы. Пионерский протокол по получению соматических гибридов из изолированных протопластных культур впервые был разработан на примере моркови (*D. carota* L.) (Krumbiegel, 1979). Данный метод с использованием протопластного слияния позволил интегрировать митохондриальную ДНК донорного вида в цитоплазму моркови, что создало условия для изучения механизмов мужской стерильности и селекции аллоплазматических линий. В дальнейшем протокол был адаптирован и модифицирован для улучшения эффективности слияния протопластов у различных генотипов моркови (Pelletier et al., 1995; Bruznican et al., 2021; Gieniec et al., 2020). Изменения включали оптимизацию условий культуры и отбора протопластов, использование индикатора успешного слияния, а также применение мтДНК-анализа для подтверждения интеграции цитоплазматических геномов (Bhattacharya et al., 2024; Ranaware et al., 2023; Chugh et al., 2020). При этом известно, что некоторые генотипы моркови обладают низкой отзывчивостью к слиянию протопластов и требуют поиска дополнительных подходов. Таким

образом, несмотря на значительный прогресс в разработке протоколов протопластного слияния у *D. carota*, исследования по их оптимизации продолжаются.

Цель – изучение возможности усовершенствования генетического разнообразия моркови (*D. carota*) с привлечением новых источников цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) на основе методов отдаленной половой и соматической гибридизации.

Для достижения этой цели решали следующие **задачи**:

1. Фенотипическое исследование цветочных структур и скриннинг проявления мужской стерильности образцов генетической коллекции отдаленнородственных видов моркови (*D. carota*), фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*).

2. Молекулярно-генетическое изучение обладающих мужской стерильностью образцов моркови (*D. carota*), фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*) с использованием ДНК-маркеров S(стерильного)-типа и N(фертильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*), оценка генетических различий МС.

3. Оценка половой совместимости (скрещиваемости) и возможности генетической интрогрессии признака мужской стерильности из образцов сельдерея (*A. graveolens*) и фенхеля (*F. vulgare*) в морковь (*D. carota*) при отдаленной половой гибридизации, в том числе при использовании технологии спасения зародышей.

4. Изучение и оптимизация элементов протокола слияния протопластов для интрогрессии признака мужской стерильности из сельдерея (*A. graveolens*) и/или фенхеля (*F. vulgare*) в морковь (*D. carota*) методом соматической гибридизации, в частности, изучение факторов, определяющих плотность протопластов из мезофилла и каллусных клеток:

- Изучение влияние концентрации осмотического агента (сорбит) при предварительной обработке на выход и жизнеспособность протопластов;
- Изучение влияния продолжительности обработки ферментами на выход протопластов;
- Изучение частоты хемослияния протопластов клеток каллуса фенхеля (*F. vulgare*) и протопластов мезофилла листа моркови (*D. carota*).

Научная новизна. Впервые показаны морфологические особенности проявления мужской стерильности цветков образцов сельдерея, проявляющейся в редукции тычинок и отсутствии фертильной пыльцы, и образца фенхеля проявляющейся в отсутствии фертильной пыльцы при нормальном,

нередуцированном строении пыльников. Впервые на основе молекулярно-генетического исследования установлено отличие генетических факторов, определяющих мужскую стерильность образцов фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*) от генетических факторов S(стерильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*) (праймеры смт-1, смт-2). Установлена половая несовместимость в комбинациях скрещивания мужски стерильных образцов фенхеля и сельдерея с фертильными образцами моркови - *F. vulgare* × *D. carota*, *A. graveolens* × *D. carota*.

Выявлено существенное влияние фактора «концентрация осмотического агента» и фактора «экспозиция» на выход жизнеспособных протопластов. Показано, что сочетание условий - 0,5 М сорбит, 6 часа экспозиция позволяют достичь максимального выхода жизнеспособных протопластов из 5-недельных листьев моркови (*D. carota*). Показана закономерность - увеличение продолжительности обработки листьев 5-недельных проростков моркови ферментами в концентрации 1% (W/V) целлюлазы и 0,1% (W/V) пектиназы приводит к увеличению выхода протопластов, и снижению их жизнеспособности. Установлена возможность хемослияния протопластов моркови (*D. carota*) из мезофилла листа и протопластов фенхеля (*F. vulgare*) из каллуса с частотой образования бинуклеарных гетерокарионов $4,6 \times 10^4$ при исходном числе протопластов в суспензии 2×10^5 .

Теоретическая и практическая значимость. Впервые выявлены, фенотипически и молекулярно-генетически охарактеризованы образцы фенхеля (*F. vulgare*) F1 «Драгон» и сельдерея (*A. graveolens*) F1 «Мамбо», F1 «Сейнния» и F1 «Балина», обладающие мужской стерильностью, контролируемой отличным от S-типа мужской стерильности моркови генетическим фактором.

Выявленные мужски стерильные образцы фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*) являются потенциальными генетическими источниками для создания аллоплазматической цитоплазматической мужской стерильности моркови (*D. carota*).

Показано отсутствие формирования полового потомства при опылении фертильной пылью моркови (*D. carota*) более 2000 цветков мужски стерильных образцов сельдерея (*A. graveolens*) и 300 фенхеля (*F. vulgare*), в том числе с использованием технологии спасения зародышей 269 семязачатков в комбинации межродового скрещивания (*A. graveolens* × *D. carota*) и 285 семязачатков в комбинации (*F. vulgare* × *D. carota*), что свидетельствует о неэффективности половой гибридизации и необходимости применения соматической гибридизации для интрогрессии признака мужской стерильности в морковь (*D. carota*).

Выявленная взаимосвязь выхода и жизнеспособности протопластов моркови позволила модифицировать метод экстракции и получить $3,41 \times 10^5$ жизнеспособных протопластов с жизнеспособностью 95%, что в 22-раза больше, чем при использовании стандартного метода.

Впервые представлен метод выделения протопластов из клеточной суспензии фенхеля (*F. vulgare*) с плотностью 1×10^6 протопластов на миллилитр.

С использованием метода хемослияния при применении полиэтиленгликоля показана частота слияния протопластов мезофилла листа (*D. carota*) и протопластов каллуса фенхеля (*F. vulgare*) на уровне 46%.

Доказано, что хемослияние является высокоэффективным методом получения бинуклеарных гетерокарионов в количестве, достигающем $4,6 \times 10^4$ ед. при исходном числе протопластов в суспензии 2×10^5 . При этом показано, что жизнеспособность соматических гибридов при инкубировании в питательной среде может достигать 43 дней.

Методология и методы исследований. Теоретическая часть исследования реализована через систематический аналитический обзор и интеграцию существующих научных данных, опубликованных в профильной литературе. Экспериментальная часть базируется на применении комплекса как стандартных, так и специализированных запатентованных методик, что обеспечило сбор репрезентативного массива экспериментальных данных. Объективность и достоверность результатов обеспечена углублённым статистическим анализом, охватывающий все ключевые параметры. Детальное описание методологических подходов, включая конкретные протоколы и используемые инструменты, представлено в разделе «Материалы и методы» диссертации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выявленные образцы фенхеля (*F. vulgare*), F1 «Драгон», и сельдерея (*A. graveolens*), F1 «Мамбо», F1 «Сейнния» и F1 «Балина», обладают генетически отличающимися типами цитоплазматической мужской стерильности от S(стерильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*).

2. Половая несовместимость при гибридизации фертильных образцов моркови (*D. carota*) с мужски стерильными образцами сельдерея (*A. graveolens*) и фенхеля (*F. vulgare*), не позволяет произвести половое семенное потомство, в том числе при использовании технологии спасения зародышей.

3. Оптимизированный метод предварительной обработки листьев 5-недельных растений моркови (*D. carota*), инкубированием в растворе сорбита с концентрацией 0,5 М в течение 6 часов, позволяет получить максимальный выход жизнеспособных протопластов - $1,51 \times 10^5$ протопластов на миллилитр с жизнеспособностью 95%.

4. Частота образования бинуклеарных гетерокарионов в результате хемослияния протопластов мезофилла листа моркови (*D. carota*) и протопластов каллуса фенхеля (*F. vulgare*) при исходном числе протопластов в суспензии 2×10^5 составляет $4,6 \times 10^4$.

Степень достоверности и апробация результатов. Обоснование данного исследования базируется на комплексном эмпирическом подходе, включающем обоснованное определение необходимой выборки и числа повторных измерений в экспериментальном дизайне. Применение строгих методов статистического анализа обеспечило всестороннюю верификацию полученных данных, что способствовало высокой достоверности и воспроизводимости результатов исследования. Основные результаты представлены на 8 международных конференциях: Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (Москва, 2022); Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2023); Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2023); Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы биологии, селекции и агротехники садовых культур» в честь 100-летия со дня рождения академика Г.И. Тараканова (Москва, 2023); Международная XXIII-й научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2023); Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 150-летию со дня рождения Миловича Александра Яковлевича (Москва, 2024); Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 150-летию со дня рождения Миловича Александра Яковлевича (Москва, 2024); International scientific conference "AGRONOMY - 2024" AgriScience (Москва, 2024).

Личный вклад соискателя. Автор самостоятельно осуществлял экспериментальные исследования, разрабатывал методологическую основу исследования и выполнял начальные экспериментальные процедуры. Кроме того, автор несет ответственность за теоретическую интерпретацию и систематизацию полученных данных.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 1 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в изданиях, входящих в МБД, 4 – статьи в сборниках конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 148 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 6 таблицы, 44 рисунков, заключения, библиографического списка, включающего 155 источника на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2021–2025 гг. на кафедре молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Идентификацию ЦМС проводили на фенотипическом и молекулярно-генетическом уровнях.

Для исследования использовали шесть различных образцов сельдерея и фенхеля. Семена были высеяны, проростки были получены в теплице в феврале 2022 года.

Выделяли ДНК из листьев моркови методом СТАВ, амплифицировали митохондриальные гены с ЦМС-специфическими праймерами, а ПЦР-продукты анализировали гель-электрофорезом и секвенированием для поиска маркеров цитоплазматической мужской стерильности. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра и отправляли на секвенирование в компанию Evrogen.

Для межвидовых скрещиваний использовали мужски стерильные и фертильные *Apium graveolens* как женские родители и фертильные *D. carota* - как мужские. Скрещивания проводили весной 2023–2024 годов вручную. Через 10–30 дней оценивали развитие зародышей, а для их спасения извлекали семязачатки и культивировали на среде MS.

Выделяли протопласты по разным протоколам для максимального выхода, затем разработали собственный. Протопласты получали из цитоплазматически мужски стерильного донора (сельдерея, фенхеля) и фертильного реципиента (моркови), используя разные растительные ткани.

Провели эксперименты по созданию гибридов двумя методами: соматической гибридизацией и половым скрещиванием со спасением зародышей. Для слияния использовали протопласты моркови (акцептор) и фенхеля ЦМС (донор) в 0,5 М маннитоле при плотности 1×10^5 протопластов/мл в соотношении 1:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скрининг цитоплазматической мужской стерильности у отдаленно родственных видов *D. carota*

Фенотипические исследования флоральных структур. Согласно фенотипическим наблюдениям, три образца сельдерея (Мамбо, Сейнния, Балина) демонстрируют стерильность (рис. 1.а), все они имеют атрофированные

пыльники, вероятно, тычинки целиком. У образца фенхеля (Драгон) также наблюдалось проявление стерильности, однако пыльники имеют нормальное нередуцированное строение (рис. 1 с).

У моркови мужская фертильность фенотипически может быть охарактеризована несколькими отличительными признаками, включая производство нормальных пыльцевых зерен, нормальную структуру пыльников и отсутствие аномальных цветочных структур (рис. 1.b). И наоборот, мужская стерильность может быть распознана по наличию сморщенной, слегка окрашенной пыльцы, деформированной структуре пыльников.

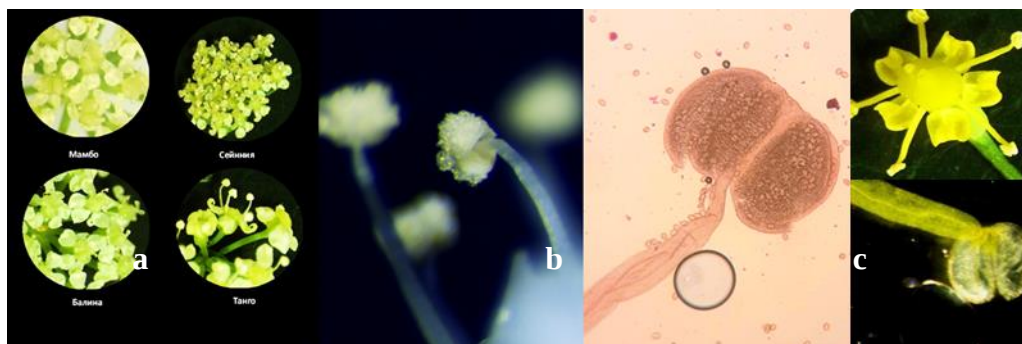


Рисунок 1. а) Цветочная детекция: у сельдерея образцов Мамбо, Сейнния и Балина атрофированные пыльники, у Танго — нормальные и фертильные; б) Пыльник моркови с фертильными пыльцевыми зернами и сами зерна при окрашивании ацетокармином.; с) Цветочная детекция фенхеля образца Драгон выявила мужскую стерильность: пыльники нормальны внешне, но не содержат фертильных пыльцевых зерен

Молекулярно-генетические исследования типов ЦМС в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея. Исследование наличия молекулярных маркеров мужской стерильности моркови в сельдерее и фенхеле, установило, что пары праймеров cmt1-cmt2 эффективно различали ЦМС и фертильные образцы моркови, давая ампликоны разного размера при традиционной ПЦР. Праймеры cmt3-atp1d1 и cmt4-atp1d1 не амплифицировали маркеры у большинства образцов (СКС, Канада, Вильмарин).

В соответствии с используемыми праймерами, маркер S- и N-типа цитоплазмы моркови (*D. carota* L.), амплифицируемый с праймерами (сmt-1 и сmt-2) показывает, что в образцах моркови с цитоплазматической мужской стерильностью полоса на уровне 320 п.н., а в фертильных образцах с нормальной цитоплазмой полоса на уровне 390 п.н.

Только у моркови получены ожидаемые результаты благодаря специфичным праймерам. Маркеры нормальной и стерильной цитоплазмы моркови не амплифицировались у образцов сельдерея и фенхеля. Линии моркови Тайфун (фертильная — 390 п.н., стерильная — 320 п.н.), Канада (390 п.н.), Вильмарин

(фертильная) и СКС (стерильная — 320 п.н.) показали характерные уровни полос маркера.

У образцов сельдерея "Мамбо", "Сейнния", "Балина" и фенхеля "Дракон" маркеры стерильной цитоплазмы моркови не обнаружены, несмотря на фенотипическое проявление мужской стерильности. Данные стерильные растения могут быть донорами протопластов для слияния с морковью при создании аллоплазматической цитоплазматической мужской стерильности моркови.

Половая отдаленная гибридизация

Эксперимент проводили весной 2023 и 2024 годов. В 2023-м опылено 24 зонтика сельдерея и 8 фенхеля пылью моркови; для спасения зародышей использовали 18 зонтиков сельдерея (684 плода) и 6 фенхеля (102 плода). В 2024-м опылено 28 зонтиков сельдерея и 11 фенхеля; спасали зародыши из 23 зонтиков сельдерея (828 плодов) и 9 фенхеля (144 плода). Остальные зонтики оставляли для естественного созревания — семян не образовалось. Для спасения отбирали только здоровые плоды (таблица 1).

Таблица 1. Статистический учет числа зонтиков, плодов и семязачатков при отдаленной половой гибридизации сельдерея и моркови, фенхеля и моркови.

Культура	Сезон	Число опыленных зонтиков	Число собранных зонтиков после опыления	Число цветков на отобранных зонтиках	Число опыленных цветков, отобранных для спасения зародышей	Число изолированных семязачатков
Сельдерей	2023	24	18	684	286	126
Сельдерей	2024	28	23	828	302	143
Фенхель	2023	8	6	102	83	150
Фенхель	2024	11	9	144	79	135

Перекрестное опыление фенхеля морковью приводило к образованию семязачатков примерно в 4 раза чаще, чем с сельдереем. Для преодоления постзиготической несовместимости применяли спасение зародышей: семязачатки изолировали через 10–30 дней, стерилизовали и культивировали на модифицированной среде MS с фитогормонами и без. Большинство культивировали целиком, некоторые с надрезами, но семязачатки фенхеля и сельдерея не развивались на любой среде. Из-за неэффективности отдалённой гибридизации дальнейшие эксперименты были сосредоточены на соматической гибридизации протопластов.

Соматическая гибридизация

Изучение и разработка технологии выделения протопластов.

Протопласты были выделены из ЦМС растения-донора и фертильного растения-реципиента, которые обладают способностью к слиянию и гибридизации клеток.

Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов мезофилла листа. Были применены три различных протокола, результаты изоляции приведены в таблице 2.

Таблица 2. Плотность выделенных протопластов мезофилла в соответствии с различными протоколами

Источник	Среднее значение плотности протопластов	Сравнение с допустимой плотностью для применения фузии	Показатель успешности выделения
Sofiari et al. (1998)	7467	$< 10^5$	73%
Baranski et al. (2007)	12340	$< 10^5$	61%
Meyer et al. (2022)	9113	$< 10^5$	57%

Все три протокола дали низкую плотность протопластов (меньше 10^5 протопластов/мл), недостаточную для слияния и регенерации. Хотя метод Bruznican et al. (2007) обеспечивал наибольший выход, жизнеспособность протопластов была ниже. Поэтому разработали новый протокол, оптимизированный для Ариасеae, устраняющий эти недостатки.

Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток. Были применены три различных протокола, результаты изоляции приведены в таблице 3.

Таблица 3. Плотность выделенных протопластов из клеточной суспензии в соответствии с различными протоколами.

Источник	Среднее значение плотности протопластов	Сравнение с допустимой плотностью для применения фузии	Показатель успешности изоляции
Wen et al. (2012)	6853	$< 10^5$	90%
Grzebelus et al. (2012)	15798	$< 10^5$	82%
Poddar et al. (2020)	11099	$< 10^5$	64%

Все три протокола выделения протопластов дают плотность ниже минимально необходимой для слияния и регенерации (10^5 протопластов/мл). Метод Grzebelus et al., (2012) обеспечивает большее количество протопластов, но с меньшей жизнеспособностью. На основе анализа ранее известных методов разработан новый протокол, оптимизирующий выделение для улучшения качества и количества протопластов.

Разработка протокола для изоляции протопластов мезофилла из проростков моркови. Оценивали параметры выделения протопластов, включая концентрацию сорбита/маннитола, продолжительность предплазмолиза, время обработки ферментами, концентрацию используемых ферментов, количество и типы промывочных растворов, а также диаметр ячеек при фильтрации с использованием листьев моркови. Наконец, мы изучили, как эти переменные влияют на жизнеспособность и выход протопластов моркови.

Влияние концентрации сорбита при предварительной обработке на выход и жизнеспособность протопластов. Сорбит применяли как единственный осмотический агент. Выход протопластов из листьев моркови максимален $3,41 \times 10^5$ протопластов/г FW при 1 М сорбита и 4 часах ферментативной обработки ($P \leq 0,05$). Жизнеспособность достигала 95% при 0,5 М и 6 часах обработки ($P \leq 0,05$), но снижалась при больших концентрациях и длительном времени. Оптимальной считается предварительная обработка 0,5 М сорбитом (рис. 3).



Рисунок 3. Влияние концентрации сорбита на выход и жизнеспособность протопластов моркови ($P \leq 0,05$), что оценивалось с помощью теста LSD. Приведенные значения представляют собой среднее стандартное отклонение $\pm$ SD ($n = 3$)

Статистический анализ показал отсутствие значимой разницы в жизнеспособности протопластов при 0,5 М сорбита и 4 или 6 часах ферментной обработки, а также при 0,3 М и 6 часах (табл. 4). Концентрация сорбита (0,3–1 М) и время обработки (2–6 ч) существенно влияют на выход жизнеспособных протопластов моркови. Оптимальными являются 0,5 М сорбита и 6 часов экспозиции для максимального выхода жизнеспособных протопластов *D. carota*.

Влияние продолжительности обработки ферментами на выход протопластов. При 2 часах обработки выход протопластов был низким. Увеличение времени до 4 часов привело к значительному росту выхода протопластов ($3,41 \times 10^5$ протопластов/г FW) при снижении жизнеспособности до 81%. При 6-часовой обработке с 0,5 М маннитолом выход составил $1,5 \times 10^5$ протопластов/г FW с хорошей жизнеспособностью. Использование 1 М маннита при 6 часах дало высокий выход ($2,9 \times 10^5$ протопластов/г FW), но с пониженной жизнеспособностью (79%) и повреждением протопластов (рис. 4).

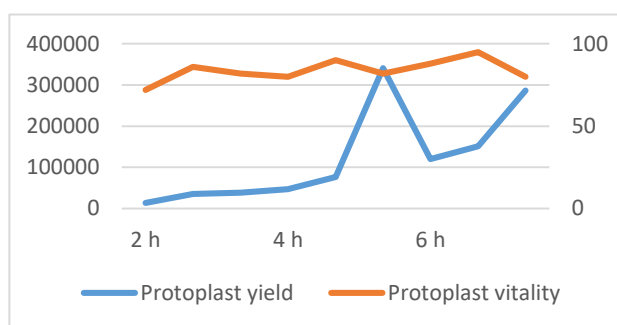
Таблица 4. Влияние концентрации предварительной обработки сорбитом и времени обработки ферментами на выход протопластов и их жизнеспособность: по результатам статистического анализа PAST.

Сорбит, концентрация предварительной обработки	Время обработки ферментов, ч	Выход протопластов, ед.	Число жизнеспособных протопластов, ед.	Жизнеспособность, %
0.3 М	2	13800±1818e	9993.33±1350f	72.46±2e
0.5 М		35133.33±5402de	30272.33±5218ef	85.68±2bcd
1 М		38666.67±1832de	31807.33±1262ef	82.35±2bcd
0.3 М	4	47166.67±3226de	37703.67±2874ef	79.86±1de
0.5 М		76366.67±3634cd	68762.33±4314de	89.91±1ab
1 М		340600±22010a	277512±13607a	81.66±2cd
0.3 М	6	119700±13369bc	105986±12184cd	88.48±1abc
0.5 М		151000±4513b	143483.67±4908c	95a
1 М		286733.33±18751a	228593.33±13946b	79.77±1de

Примечание: значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b, c), согласно t-критерию Стьюдента, не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ($P \leq 0.05$)

Рисунок 4. Влияние продолжительности обработки ферментами на выход протопластов и жизнеспособность протопластов моркови. (P,05) согласно тесту LSD. Представленные значения обозначают среднее $\pm$ SD (n = 3) стандартное отклонение

Средний выход протопластов составил $1,51 \times 10^5$, при этом жизнеспособность достигала 95 %. Важно подчеркнуть, что жизнеспособность изолированных протопластов имеет большее значение, чем их общий выход.



Увеличение времени ферментативного гидролиза свыше 6 часов приводит к разрыву плазматической мембраны, снижению выхода и жизнеспособности

протопластов, а также накоплению клеточных остатков. Оптимальное время ферментативной обработки составляет 6 часов.

Разработка протокола выделения протопластов мезофилла.

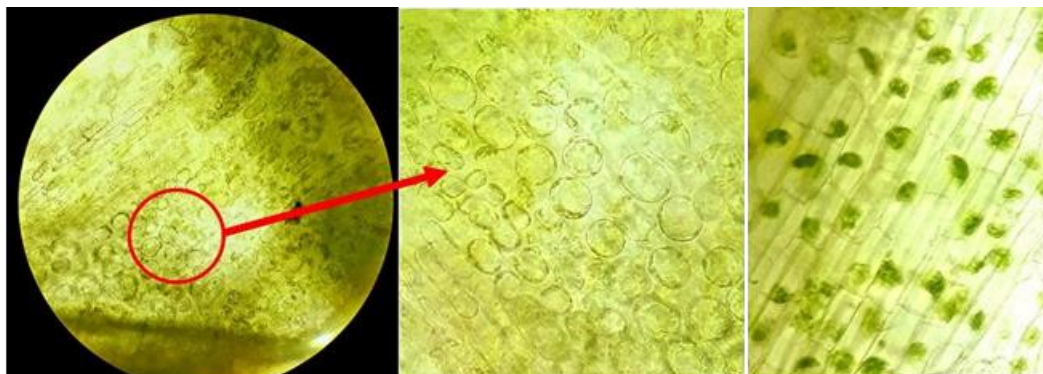


Рисунок 5. Растительные ткани после плазмолиза демонстрируют сокращение внутриклеточной плазмы в результате потери воды (масштабная линейка =50 мкм, увеличение 400×)

После стерилизации, семена сеют на твердую среду MS с сахарозой и агаром, выдерживают при $24\pm 1^\circ\text{C}$ в темноте; через 10 дней проростки переносят на регенерационную среду. Протопласты выделяют из листьев *in vitro* проростков после инкубации ткани в преплазмолизном растворе (0,5 М сорбитол, 0,05 М CaCl_2) при $24\pm 1^\circ\text{C}$ в темноте 1 час для осмотической поддержки (рис. 5). Затем ткани обрабатывают ферментной смесью (0,5% целлюлазы, 0,1% пектиназы, 20 мМ MES, 5 мМ CaCl_2 и 0,6 М маннитола, pH 5,6) при $24\pm 1^\circ\text{C}$ и встряхивании 30 об/мин в течение 6 ч. Протопласты освобождают, встряхивая в растворе W5, фильтруют через нейлоновые фильтры 100 и 40 мкм, отжимают остатки, повторно фильтруют и центрифугируют при 150 об/мин 10 минут. Осадок дважды ресуспендируют в 0,5 М маннитоле, затем в 2 мл MMG с MES-буфером, маннитолом и MgCl_2 . Под микроскопом протопласты имеют сферическую форму и зелёную флуоресценцию, подтверждающую их жизнеспособность (рис. 6).

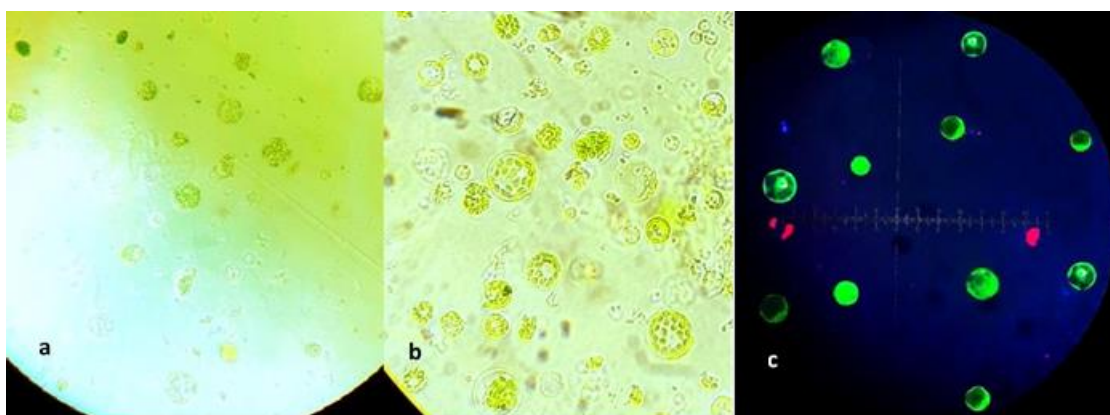


Рисунок 6. Изолированные протопласты моркови: а) использование 0,5 М сорбита при времени обработки ферментов 4 ч; б) 0,5 М сорбита при 6 ч; с) зеленая флуоресценция жизнеспособных протопластов после окрашивания FDA

Разработанный протокол изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля. Стерилизованные семена фенхеля высевают на среду MS с витаминами, сахарозой, NaFeEDTA, глицином и агаром, pH 5,8. Пластины инкубируют при $24\pm 1^\circ\text{C}$, ростки через 15 дней переносят на такую же среду.

Индукция каллуса фенхеля: экспланты листьев и черешков культивируют на среде MS с 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 7 г/л агара при $24\pm 1^\circ\text{C}$ в темноте. Рыхлые каллусы появляются через 12 дней, обновляются ежемесячно до нужного объема для клеточной суспензии. Были получены протопласты высокого качества и в большом количестве - 10^6 , здоровые, сферической формы (рис. 7.а). Из протопластов, полученных из фенхеля, образуются микрокаллусы (рис. 7. б) и, наконец, каллус (рис. 7. с).

Инициация суспензии клеток: Суспензионные культуры фенхеля получали, культивируя 250 мг каллуса в 6 чашках с 5 мл жидкой среды MS (30 г/л сахарозы, 0,5 г/л гидролизата казеина, 0,6 мг/л 2,4-Д, 0,55 мг/л кинетина) при $24\pm 1^\circ\text{C}$, 60 об/мин. Через неделю каллус удаляли, культуры еженедельно обновляли и разбавляли свежей средой 1:1. Протопласты выделяют из суспензионных культур фенхеля (5–9 недель) 4 дня после субкультивирования. Ткань (~1 г) инкубируют ночи в ферментном растворе (целлюлаза 0,5%, пектиназа 0,05%, MES 20 mM, CaCl_2 5 mM, маннитол 0,6 M) при $24\pm 1^\circ\text{C}$ с встряхиванием. Смесь фильтруют через 100 и 40 мкм сита, центрифугируют при 150 g 10 мин. Протопласты промывают средой W5 и маннитолом, центрифугируя после каждого промывания. Для очистки от мертвых клеток и остатков используют фильтрацию и градиентное центрифугирование.

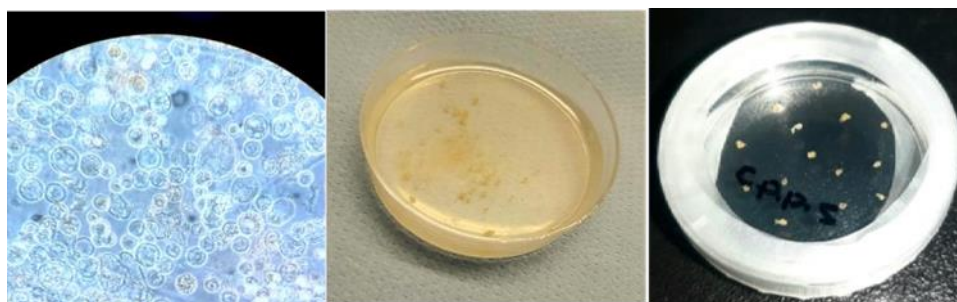


Рисунок 7. а) выделенные протопласты; б) микрокаллусы, полученные при культивировании протопластов; с) Микрокаллусы, перенесенные на твердую среду

Хемослияние протопластов суспензии клеток *Foeniculum vulgare* с протопластами мезофилла *D. carota*. Очищенные протопласты из клеток каллуса и протопласты мезофилла смешивали в соотношении 1 : 1 в предфузионном растворе. Протопласты, подвергшиеся химически индуцированному слиянию, начали непосредственно сливаться через 1 день.

Наблюдалось достаточно большое количество слитых один к одному протопластов (две родительские клетки слились в бинуклеарный гетерокарион), а некоторые слитые протопласты представляли собой слияние нескольких родительских протопластов (рис. 8. а).

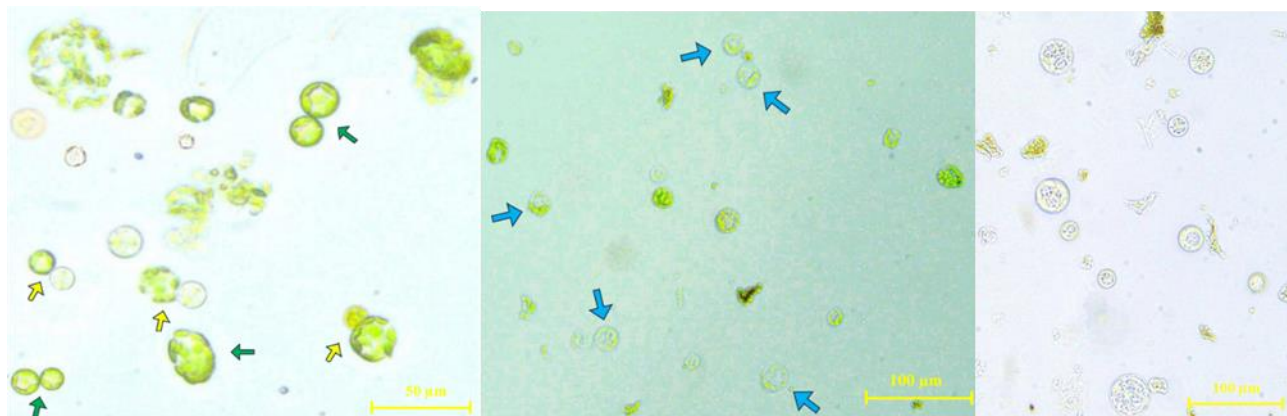


Рисунок 8. а) Сближение в питательной среде протопластов: протопласты мезофилла и каллуса (желтые стрелки), сближение протопластов клеток мезофилла и мезофилла (зеленые стрелки); б) Клетки соматических гибридов через 2 дня культуры, синие стрелки указывают на слившиеся протопласты с зеленым и светло-прозрачным цветами; с) Клетки соматических гибридов после 5 дней культивирования

Через 2 дня культивирования слившиеся протопласты можно было легко отличить от других клеток благодаря зеленому цвету хлоропластов из протопластов мезофилла и светлому прозрачному цвету протопластов клеточной суспензии (рис. 8. б). Через 5 дней после слияния в цитоплазме протопластов наблюдались диффузные зеленые компоненты, что осложняло их отчетливое различение и приводило к разрыву некоторых клеток (рис. 8. с).

Затем, еще через 15 дней, большинство клеток увеличилось (рис. 9).

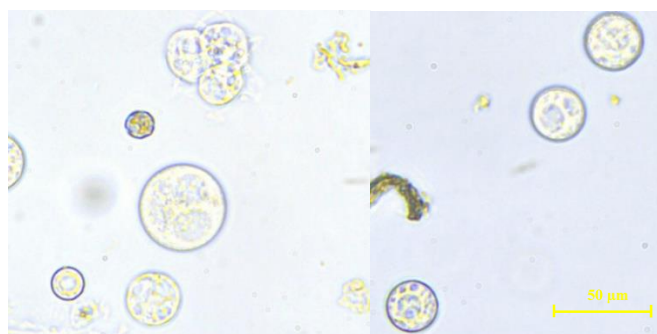


Рисунок 9. Клетки соматических гибридов после 20 дней культивирования

Количество слившихся клеток и гибридных слившихся клеток от общего культивируемых протопластов было тщательно подсчитано. Общее количество культивированных клеток составило 2×10^5 , общее количество слитых клеток - $6,8 \times 10^4$ (частота слияния 68%), а количество гибридных слитых клеток - $4,6 \times 10^4$ (частота слияния 46%).

Максимальная продолжительность сохранения жизнеспособности этих клеток составила 43 дня, после чего они начали приобретать коричневатый оттенок, свидетельствующий о их гибели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате фенотипического анализа генеративной сферы, соцветий и цветков, растений генетической коллекции фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*) выявлены образцы сельдерея, F1 «Мамбо», F1 «Сейнния» и F1 «Балина», а также образец фенхеля F1 «Драгон», растения которых проявляли мужскую стерильность.

Установлено, что мужская стерильность образцов сельдерея проявляется в редукции тычинок и отсутствии фертильной пыльцы, образца фенхеля – в отсутствии фертильной пыльцы при нормальном, нередуцированном строении пыльников.

Молекулярно-генетическое исследование мужски стерильных образцов фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*) выявило отличие ДНК-маркеров (праймеры смт-1, смт-2) цитоплазматических факторов, определяющих МС фенхеля и сельдерея, от S(стерильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*). Таким образом, показано, что мужски стерильные образцы сельдерея F1 «Мамбо», «Сейнния», «Балина» и фенхеля F1 «Драгон» могут быть использованы в селекции моркови в качестве новых источников аллоплазматической цитоплазматической мужской стерильности.

В результате анализа скрещиваемости при ручном опылении фертильной пыльцой моркови (*D. carota*) более 2000 и 300 цветков мужски стерильных образцов сельдерея (*A. graveolens*) и фенхеля (*F. vulgare*), соответственно, в том числе при использовании технологии спасения зародышей при изоляции и искусственном инкубировании 269 семязачатков сельдерея (*A. graveolens*) и 285 семязачатков фенхеля (*F. vulgare*), показана половая несовместимость и невозможность произвести половое потомство при гибридизации в комбинациях *F. vulgare* × *D. carota*, *A. graveolens* × *D. carota* с использованием представленных мужски стерильных образцов фенхеля, сельдерея и фертильных образцов моркови.

Статистический анализ выхода жизнеспособных протопластов мезофилла при предварительной обработке 5-недельных листьев моркови различными концентрациями осмотического агента, сорбита, 0,3 М, 0,5 М, 1,0 М при экспозициях в течение 2, 4 и 6 часов позволило установить достоверность влияния этих факторов на выход жизнеспособных протопластов и оптимизировать метод предварительной обработки для получения максимального

выхода жизнеспособных протопластов из листьев *D. carota* в комбинации условий: 0,5 М сорбит, 6 часа экспозиция.

Показано, что с увеличением продолжительности обработки ферментами 1% (W/V) целлюлазы и 0,1% (W/V) пектиназы при инкубировании листьев 5-недельных проростков моркови в течение 2, 4 и 6 часов увеличивается выход протопластов, однако при этом снижается их жизнеспособность.

Использование выявленных закономерностей в модифицированном протоколе позволило повысить выход жизнеспособных протопластов в экстрагированном виде до $3,41 \times 10^5$ протопластов на миллилитр с жизнеспособностью 95%, что в 22-раза превышает число протопластов, изолируемых по стандартному протоколу в нашем эксперименте, и соответствует требованиям успешного слияния или регенерации протопластов (плотность в диапазоне $5 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ протопластов на миллилитр).

В результате исследования впервые представлен успешный метод выделения протопластов из клеточной суспензии фенхеля (*F. vulgare*) с плотностью, достигающей 1×10^6 протопластов на миллилитр.

В результате хемослияния с использованием полиэтиленгликоля протопластов мезофилла листа моркови (*D. carota*) и протопластов каллуса фенхеля (*F. vulgare*) частота образования бинуклеарных гетерокарионов составила $4,6 \times 10^4$ при исходном числе протопластов в суспензии 2×10^5 , при этом старт слияния происходил в 1-й день, на 2-й день соматически гибридные клетки выделялись в общей массе объединяя зеленую часть протопластов мезофилла листа моркови и прозрачную частей протопластов каллуса фенхеля. Максимальная продолжительность жизнеспособности этих клеток составила 43 дня.

Рекомендации производству

1. В селекционных программах по созданию аллоплазматической цитоплазматической мужской стерильности моркови использовать в качестве источников признака мужски стерильные образцы сельдерея (*A. graveolens*), F1 «Мамбо», F1 «Сейнния» и F1 «Балина», а также образец фенхеля (*F. vulgare*) F1 «Драгон», растения которых не обладают маркерами S(стерильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*).
2. В методах слияния протопластов для получения максимального выхода жизнеспособных протопластов мезофилла из листьев *D. carota* рекомендуется инкубировать ткани пятинедельных растений моркови в 0,5 М растворе сорбита в течение 6 часов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Алжарамани Насим. Оптимальные параметры для изоляции протопластов мезофилла моркови *in vitro* / Алжарамани Насим, С.Г. Монахос // Овощи России. – 2025. – № 3. – С. 5–9. DOI: 10.18619/2072-9146-2025-3-5-9.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

2. Aljaramany Naseem. Somatic hybridization in agricultural crops improvement: An environmentally amiable era in biotechnology / Aljaramany Naseem, A.V. Vishnyakova, S.G. Monakhos // Caspian J. Environ. Sci. – 2024. – № 22(5). – P. 1233–1241. DOI: 10.22124/cjes.2024.8236.

3. Aljaramany Naseem. Isolation and regeneration of cell suspension-derived *Foeniculum vulgare* protoplasts / Aljaramany Naseem, S.G. Monakhos // BIO Web of Conferences. – 2024. – № 58. – P. 05008. DOI: 10.1051/bioconf/202413905008.

Публикации в сборниках и материалах конференций:

4. Алжарамани Насим. Оптимизация технологии выделения протопластов с использованием листьев *D. carota* (моркови) *in vitro* / Алжарамани Насим, С.Г. Монахос // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича. Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2024. – С. 17-19.

5. Алжарамани Насим. Создание аллоплазмической МС моркови (*D. carota* L.) слиянием протопластов / Алжарамани Насим, С.Г. Монахос // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева, г. Москва, 7-9 июня 2023 г.: Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2023. – С. 17-20.

6. Aljaramany Naseem. Carrot protoplast isolation and fusion with relatives: A key tool for biotechnological and plant breeding research / Aljaramany Naseem, S.G. Monakhos // Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева. Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2023. – С. 515-518.

7. Aljaramany Naseem. Development of alloplasmic male-sterile line of carrot by protoplast fusion / Aljaramany Naseem, S.V. Feopentova // Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костиков. Сборник статей. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2022. – С. 22-24.