

P. Corral-Martínez, C. Camacho-Fernandez, R. Mir, J. M. Seguí'-Simarro // Doubled haploid technology. – Humana, New York, NY, 2021. – С. 129-144.

3. Zaki M. A. M., Dickinson H. G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus* // *Protoplasma*. – 1990. – Т. 156. – С. 149-162.

4. Вишнякова А. В. Факторы прямого прорастания микроспорогенных эмбриоидов *Brassica Napus L*/ А.В. Вишнякова, А. А. Александрова, С. Г. Монахос // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2023. – Т. 1. – №. 6. – С. 43-53.

УДК 631.527

СОЗДАНИЕ АЛЛОПЛАЗМИЧЕСКОЙ МС МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA L.*) СЛИЯНИЕМ ПРОТОПЛАСТОВ

Алжарамани Насим, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений - ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, naseemjihadja@gmail.com

Аннотация: Одним из основных методов в селекции моркови (*Daucus carota L.*), является создание F1-гибридов на основе ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности). Аллоплазмики образуются, когда цитоплазма одного вида заменяется цитоплазмой другого вида посредством обратного скрещивания или биологических методов, таких как соматическая гибридизация [4]. Путем замены цитоплазмы клеток моркови цитоплазмой клеток родственных видов с мужской стерильностью (*Сельдерей, Ариум graveolens, Фенхель Foeniculum vulgare*) и обеспечения возможности регенерации этой аллоплазматической клетки во взрослое растение, получают растение моркови, имеющее как ЦМС, так и желаемые коммерческие характеристики.

Ключевые слова: *Daucus carota*, слиянии протопластов, гибрид, ЦМС цитоплазматической мужской стерильности, самонесовместимость

Морковь *Daucus carota L.* входит в десятку самых экономически важных овощных культур во всем мире как по площади производства, так и по рыночной стоимости.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) у моркови принимает две основные формы: «brown anthers» и «petaloid». Признак растения цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) определяется митохондриальным геномом и связан с фенотипом стерильности пыльцы, который может подавляться или противодействовать ядерным генам, известным как гены-восстановители фертильности. [1]

ЦМС, вызванная мутациями в митохондриальном геноме, обнаруживается у высших растений и увеличивает гетерозис и улучшает

генетические ресурсы. Митохондриальные маркеры можно использовать для дифференциации различных типов источников ЦМС. Молекулярные маркеры, которые могут предсказать статус ЦМС на ранней стадии развития, будут ценными инструментами в программах селекции моркови и производства семян, а также для фундаментальных исследований мужской стерильности [2].

В отношении моркови гибриды F1 ценны за однородность созревания, высокую раннюю и общую урожайность, лучшее качество сырной массы в отношении уплотнения и цвета, а также устойчивость к насекомым-вредителям, болезням и неблагоприятным погодным условиям. Эффективный, надежный и проверенный метод. Ручной метод кастрации и опыления моркови непригоден для коммерческого использования из-за несовместимого размера и структуры цветков. До настоящего времени гибриды моркови разрабатывались с использованием системы самонесовместимости. В последние годы также сообщалось о значительном гетерозисе у гибридов, созданных с использованием системы ЦМС, для показателей урожайности, связанных с урожайностью и качественных признаков [3].

Материалы и методы

Растительный материал:

Гибридные семена сельдерея (Сиенна F1, Мамбо, Балена F1, Кельвин RZ), Сорт (Танго), фенхеля и сельдерея были заказаны у компании Rijk Zwaan, и посеяны чтобы выбрать MS-родственники моркови.

Цветы этих гибридов были исследованы визуально, микроскопически и на молекулярном уровне, чтобы проверить наличие у них признака ЦМС.

1. Молекулярно: для идентификации ЦМС Выделена ДНК 11 образцов (5 моркови, 5 сельдерея и 1 фенхеля), из растений, сформировавших настоящие листья, затем провести молекулярное маркирование с использованием методов ПЦР и гель-электрофореза для проверки наличия ЦМС в их геномах.

2. Визуально: каждое растение оценивали визуально по пыльцевым зернам и пыльникам их цветков.

3. Микроскопически: увидеть под микроскопом наличие пыльцевых зерен.

Приготовление суспензии клеток, полученных из протопластов *Daucus carota* L.

Семена моркови поверхностно стерилизовали в 70%-ном этиловом спирте в течение 5 мин, затем 15 мин в 0,75%-ном растворе NaOCl с добавлением 2 капель твина 20, затем 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и высевали в чашки Петри, содержащие среду MS с добавлением витаминов. с 20 г/л сахарозы, 25 мг/л NaFeEDTA, 2 мг/л глицина и 6 г/л агара и инкубировали при 22°C в темноте для прорастания и роста проростков. Семидневные проростки пересаживали на ту же плотную среду [5].

Индукция каллуса и инициация клеточной суспензии:

Листовые и черешковые эксплантаты культивировали на среде MS с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,5 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), 0,5 мг/л кинетина и 7 г/л

агара. Культуры инкубировали при температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$ в темноте, рыхлый каллус отбирали и обновляли ежемесячно.

Культуры клеточной суспензии инициировали культивированием 250 мг рыхлого каллуса в чашках Петри, содержащих жидкую суспензионную среду на основе среды MS с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,6 мг/л 2,4-Д и 0,55 мг/л кинетина. Культуры инкубировали при $22\pm 2^\circ\text{C}$ в темноте при постоянном перемешивании (100 rpm) [5] Рис1.

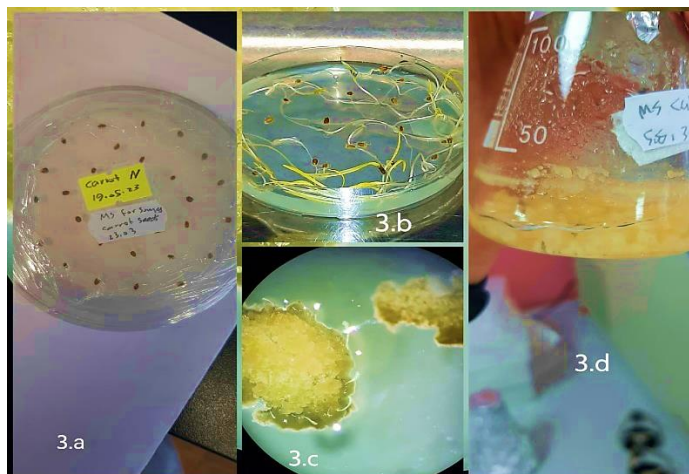


Рисунок 1. а. семена моркови после стерилизации и выращивания в чашках Петри, б. рассада моркови, с. образование костной мозоли, д. стабилизированная мозолистая суспензия

Выделение протопластов:

Протопласты выделяли из 5-9-недельных суспензионных культур на 4-й день после посева по протоколу Grzebelus et al. (2012) с некоторыми изменениями. Около 1 г сырой массы суспензии клеток инкубировали в 10 мл раствора фермента, который содержал 0,5% (масса/объем) целлюлазы, 0,05% (масса/объем) пектолиазы, 20 мМ сольвата, 5 мМ CaCl_2 и 0,6 М маннитола. Ферментирование проводили в течение ночи при 22°C при осторожном встряхивании (30 rpm) в темноте. После ферментирования, протопласты просеивали через нейлоновые фильтр 100 мкм и 40 мкм, промывали 15 мл среды W5 и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Протопласты в осадке ресуспендировали в 10 мл 0,6 М сахарозы, поверх которой был нанесен 1 мл среды W5. Образцы центрифугировали при 80 g в течение 10 мин, собирали жизнеспособные протопласты, локализованные в интерфазе между двумя растворами, после чего промывали в 10 мл среды W5 и центрифугировали при 100 g в течение 5 и 10 мин [5].

Полученные результаты:

Идентификация ЦМС родственных видов моркови

Молекулярно: результаты электрофореза показали, что ни сельдерей, ни гибриды фенхеля не обладают такой же мужской стерильностью, как у моркови, в принципе это хорошая индукция.

Визуально: 3 гибрида сельдерей бесплодны (Мамбо, Сейнния и Балина), а также гибрид фенхеля (Дракон)

Микроскопически: это подтверждается теми же точками визуальных результатов; таким образом, мы можем использовать эти стерильные гибриды в качестве доноров протопластов.

Приготовление суспензии клеток, полученных из протопластов *Daucus carota* L.

Протопласты были приобретены, но в низкой концентрации, недостаточной для слияния. Примечательно, что здоровые протопласты были получены из суспензии каллуса, профильтрованной на 40 мкм, поскольку это позволяет пропускать протопласты без других клеток или примесей. Слияние протопластов будет проводиться с использованием системы электропорации Gene Pulser Xcell, для получения аллоплазматических протопластов.

Библиографический список:

1. Philipp W. Simon, Roger E. Freeman, Jairo V. Vieira, Leonardo S. Boiteux, Mathilde Briard, Thomas Nothnagel, Barbara Michalik, and Young-Seok Kwon, Carrot, published by USDA-ARS, University of Wisconsin, Department of Horticulture 2008. P.327

2. Chetna Chugh, Sheshnath Mishra, Manisha Mangal, Shrawan Singh and Pritam Kalia, CMS Line in Carrot, Int.J. Curr.Microbiol. App.Sci (2020) 9(2): 51-65

3. Christine D. Chase, Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions, Horticultural Sciences Department, University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, FL 32611-0690, USA. 2006. P.83

4. T. NOTHNAGEL, P. STRAKA, and B. LINKE, Male sterility in populations of *Daucus* and the development of alloplasmic male sterile lines of carrot, Institute of Breeding Methods in Vegetables\ Federal Centre of Breeding Research on Cultivated Plants BAZ, DĐ09004 Berlin\ Germany, 2000. P. 147-158.

5. Silvia Bruznican, Tom Eeckhaut, Johan Van Huylenbroeck, Hervé De Clercq, Danny Geelen. Regeneration of cell suspension derived *Apium graveolens* L. protoplasts, Plant Cell Tiss Organ Culture, 2017, 1-12.

УДК 581.143.6

ОПЫТ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *HYDRANGEA MACROPHYLLA* THUNB.

Ахметова Лилия Рафисовна, аспирант кафедры декоративного садоводства и газоноведения ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, liliyashka94@mail.ru

Раджабов Агамагомед Курбанович, профессор кафедры плодоводства, виноградарства и виноделия, доктор с.-х. н. ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, plod@rgau-msha.ru

Аннотация: Изучены морфогенетические особенности культивирования гортензии крупнолистной в условиях *in vitro*. Исследовано влияние типа