

ИНСТИТУТ САДОВОДСТВА И ЛАНДШАФТНОЙ АРХИТЕКТУРЫ

СЕКЦИЯ: «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ САДОВОДСТВА И ЛАНДШАФТНОЙ АРХИТЕКТУРЫ»

УДК 631.527

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИСТЬЕВ DAUCUS CAROTA (МОРКОВИ) *IN* *VITRO*

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

Монахос Сократ Григорьевич, д.с.-х.н., профессор РАН, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ –МСХА имени К.А. Тимирязева *s.monakhos@rgau-msha.ru*

Аннотация: Для использования потенциала применения технологии слияния протопластов для решения селекционных задач в рамках селекционных программ по созданию F1-гибридов моркови изучены факторы, оказывающие влияющие на качественные и количественные характеристики метода выделение протопластов: преплазмолиз и экспозиция ферментативной обработки тканей. В результате исследования установлено, что с увеличением концентрации сорбита в течение 0,3–0,5 М выход протопластов увеличивается, а при концентрации 0,5 М жизнеспособность протопластов может достигать 95%; при увеличении времени ферментативной обработки тканей с 2 до 6 ч выход и жизнеспособность протопластов достигают максимума через 6 ч. Между тем, предварительная обработка 0,5 М сорбитом в течение одного часа, комбинация 1% целлюлазы, 0,1% пектиназы и 6-часовое время инкубации были наиболее подходящими условиями для условия разделения.

Ключевые слова: *Daucus carota*, протопласт, жизнеспособность, преплазмолиз, регенерация,

Морковь (*Daucus carota* L. subsp. *sativus* Hoffm., $2n = 2x = 18$) является важной корнеплодной культурой во всем мире и одним из первых растений, успешно культивируемых *in vitro*. В настоящее время селекционное улучшение моркови во всем мире основывается на расширении генетического разнообразия с применением современных биотехнологических методов [1,6,7]. Культура протопластов моркови может послужить биотехнологической платформой для реализации альтернативных биотехнологических и молекулярных исследований и методов селекции. Протопласт – это растительная клетка, лишенная клеточной стенки ферментативным или иным методом, сохраняющая тотипотентность и жизнеспособность [2]; Целью данной работы является изучение основных факторов и разработка

эффективной системы выделения и очистки протопластов моркови для решения селекционных задач.

Материалы и методы

Растительный материал, донор протопластов: линия моркови Виль-1 из генетической коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева». Протопласты выделяли из листьев растений, выращенных из семян *in vitro*. Семена моркови стерилизовали трехэтапной процедурой: сначала семена инкубировали при 50°C 10 мин. на водяной бане, затем стерилизовали поверхность путем погружения в 70% и 95% этанол на 5 мин, затем в 5% NaOCl, содержащий 2 капли Твин 20 на 20 мин. Далее их трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Семена для проращивания высевали на твердую питательную среду MS [3] с витаминами, дополненную 30 г/л сахарозы и 6,5 г/л агара в чашки Петри диаметром 9 см, около 20 семян на чашку Петри, инкубировали при 24 ± 1°C в темноте.

Через 7 дней проростки переносили в чашки Петри, содержащие регенеративную среду, состоящую из макро- и микроэлементов MS, 0,1 мг/л тиамин HCl, 0,1 мг/л пиридоксин HCl, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 3,0 мг/л. глицин, мио-инозитол 100 мг/л, сахарозу 20 г/л и фитагель 2,5 г/л. Культуры хранили в климатическом помещении при температуре 24±1°C, фотопериоде 16 ч и интенсивности света 55 мкмоль м⁻² с⁻¹ [4].

Протопласты выделяли из листьев с черешками 5-недельных проростков моркови по протоколу [5] Baranski et al. (2007), с некоторыми изменениями.

Выделение протопластов:

Для выделения протопластов из листьев с черешками 5-недельных проростков моркови, около 1 г ткани помещали в стеклянную чашку Петри с 8 мл раствора для преплазмолиза (0,3/0,5/1М сорбита, 0,05 М CaCl₂·2H₂O), разрезали на мелкие кусочки и затем инкубировали в течение 1 часа в темноте при 24 ± 1С.

Ферментирование проводили в течение 2, 4 и 6 часов при 24 ± 1°C и осторожном встряхивании (30 rpm) в ферментной смеси, состоящей из 1% целлюлазы, 0,1% пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислоты (MES), 5 мМ CaCl₂·2H₂O и 0,6 М маннита, рН 5,6, стерилизованной фильтрацией (0,22 мкм).

В чашку Петри добавляли 10 мл раствора W5, осторожно встряхивая вручную в течение 1 мин для высвобождения протопластов, затем смесь фильтровали через нейлоновые фильтры 40 мкм, оставшиеся в чашке кусочки листьев перемешивали и отжимали в чашку Петри. Стенки чашки ополаскивали 5 мл W5, чтобы получить больше протопластов, и фильтровали, чтобы получить весь раствор, который затем центрифугировали при 150 gcf в течение 10 минут при комнатной температуре в качающемся бакет-ротаторе.

После центрифугирования супернатант сливали, а протопласты в осадке ресуспендировали в 5 мл 0,5 М маннита два раза и к оставшемуся осадку добавляли 2 мл MMG.

Результаты:

Условия изоляции чрезвычайно важны для эффективного высвобождения протопластов из листьев *D. carota* in vitro. Судя по результатам, наиболее подходящими условиями для выделения протопластов в исследовании были 0,5 М сорбита, комбинация 0,5% целлюлазы и 0,1% пектиназы и время инкубации 6 часов. Установленный протокол может быть использован для будущих исследований по манипулированию генами, особенно при изучении слияния протопластов.

Экспозиция ферментативной обработки является важным фактором, влияющим на эффективность изоляции протопластов. Если время слишком велико, ферментная жидкость повреждает плазматическую мембрану высвобождающегося протопласта и снижает стабильность протопласта, и слишком короткий ферментативный гидролиз не может обеспечить хорошего эффекта разделения.

Библиографический список

1. Philipp W., Roger E., Jairo V., Leonardo S., Mathilde B., Thomas N., Barbara M., and Young-Seok K., Carrot, published by USDA-ARS// University of Wisconsin, Department of Horticulture 2008. P.327
2. John M., Cell tissue and organ culture: Protoplast Culture. Encyclopedia of Rose Science// Section 5 - Chapter 6, Publisher: Academic Press. 2003. P.90-99
3. Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture// *Physiol Plant*, 1962. P.100–127
4. Ewa G., Marek S., Rafal B., An improved protocol for plant regeneration from leaf and hypocotyl-derived protoplasts of carrot// *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2012. P.101–109
5. Baranski R., Klocke E., Ryschka U., Monitoring the expression of green fluorescent protein in carrot// *Acta Physiol Plant.* 2007. P.239–246
6. Чистова А.В., Биотехнология в селекции моркови с использованием самонесовместимости// *Картофель и овощи.* 2014, № 10. С.33-36
7. Чистова А.В., Репродукция самонесовместимых линий моркови (*Daucus carota* L.) с использованием культуры тканей// *Известия ТСХА.* 2014, №3, С.43-50

УДК 635.91, 635.92

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ *Oxalis corniculata* L. И *Oxalis stricta* L.

Бакулин Семен Дмитриевич, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, bakulinsd@yandex.ru

Савинов Иван Алексеевич, профессор кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, i.savinov@rgau-msha.ru