

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА»
(ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

На правах рукописи

Алжарамани Насим

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

Специальность: 4.1.2 – селекция, семеноводство
и биотехнология растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Монахос Сократ Григорьевич,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор

Москва, 2025 г.

Оглавление

Введение.....	6
1 Обзор литературы	14
1.1 Значение моркови (<i>Daucus carota</i> L.) как овощной культуры	14
1.2 Традиционная селекция моркови:	15
1.3 Ограничения технологий традиционной селекции	15
1.4 Классификация типов мужской стерильности.....	17
1.4.1 Ядерная мужская стерильность ЯМС	17
1.4.2 Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС).....	19
1.4.3 Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность (ЯЦМС).....	21
1.5 Чувствительная к условиям окружающей среды мужская стерильность .	23
1.6 Восстановление фертильности	23
1.7 Преимущества ЦМС перед другими системами размножения	24
1.8 Молекулярные механизмы, ответственные за ЦМС	24
1.9 Цитоплазматическая мужская стерильности моркови.....	26
1.10 Эволюция митохондриальной ДНК и ЦМС у моркови	26
1.11 Применение биотехнологий для улучшения моркови	28
1.11.1 Регенерация <i>in vitro</i> и микроразмножение	28
1.11.2 Генетическая трансформация и редактирование генов	29
1.11.3 Молекулярная селекция.....	30
1.12 Протопласты как интегрированная система.....	30
1.12.1 Тотипотентные системы протопластов	30
1.12.2 Исходный материал для выделения протопластов.....	31
1.12.3 Методы выделения и изоляции протопластов	32
1.12.4 Предварительная обработка ферментативно выделенного растительного материала	33
1.12.5 Факторы, влияющие на получение протопластов	34
1.12.6 Очистка протопластов	35
1.12.7 Выход и жизнеспособность протопластов	36
1.12.8 Среда для культивирования протопластов.....	37

1.12.9 Экспериментальные системы для культуры изолированных протопластов	39
1.12.10 Условия культивирования протопластов	42
1.12.11 Регенерация растений из культуры протопластов.....	44
1.12.12 Соматическая изменчивость.....	44
1.13 Соматическая гибридизация / слияние протопластов.....	45
1.13.1 Спонтанное слияние	46
1.13.2 Индуцированное слияние.....	46
1.14 Вклад соматической гибридизации в улучшение сельскохозяйственных культур	47
1.14.1 Solanaceae (табак, картофель, томат, баклажан).....	48
1.14.2 Brassicaceae (капуста, редис, рапс).....	49
1.14.3 Apiaceae (морковь, кориандр, сельдерей, петрушка, фенхель)	50
1.14.4 Семейство травянистых Poaceae или Gramineae (кукуруза, пшеница, рис, ячмень, овес).....	51
1.14.5 Рутовые (Rutaceae) (виды цитрусовых)	52
1.14.6 Соматическая гибридизация в других важных сельскохозяйственных культурах.....	53
1.14.7 Ограничения метода соматической гибридизации.....	54
1.14.8 Выведение гибридов: стратегии получения линий ЦМС путем слияния протопластов.....	54
1.15 Цибридизация / Цитоплазматический гибрид как инструмент для создания ЦМС в растениях.....	56
1.16 Аллоплазматические линии	58
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
2.1 Скрининг на цитоплазматическую мужскую стерильность у близкородственных видов моркови	59
2.1.1 Фенотипические исследования флоральных структур в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея	60
2.1.2 Молекулярные исследования типов ЦМС в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея	60
2.1.2.1 Выделение ДНК.....	60
2.1.2.2 Комбинации праймеров и ПЦР-анализ.....	61

2.2 Анализ митохондриальной ДНК ЦМС у моркови:	62
2.3 Половая гибридизация	63
2.4 Соматическая гибридизация:	65
2.4.1 Изучение и разработка технологии выделения протопластов	65
2.4.1.1 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов мезофилла	65
2.4.1.2 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток.....	68
2.4.2 Разработка протокола для изоляции протопластов мезофилла из проростков моркови.....	71
2.4.3 Протокол изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля.....	73
2.4.4 Создание цитоплазматических мужских стерильных гибридов/цибридов.....	76
2.4.4.1 Химослияние	76
2.4.4.2 Слияние по действием электрического тока	77
3 Результаты:	79
3.1 Скрининг цитоплазматической мужской стерильности у близкородственных видов <i>D. carota</i>	79
3.1.1 Фенотипические исследования флоральных структур в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея	79
3.1.2 Молекулярно-генетические исследования типов ЦМС в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея	81
3.2 Анализ митохондриальной ДНК ЦМС-образца моркови.....	85
3.3 Половая отдаленная гибридизация	88
3.4 Соматическая гибридизация:	90
3.4.1 Изучение и разработка технологии выделения протопластов	90
3.4.1.1 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов мезофилла	90
3.4.1.2 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток.....	95
3.4.2 Разработка протокола для изоляции протопластов мезофилла из проростков моркови.....	100
3.4.3 Разработанный протокол выделения протопластов мезофилла.....	108

3.4.4 Разработанный протокол изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля	111
3.4.5 Слияние протопластов моркови с родственными видами	117
3.4.5.1 Хемослияние протопластов суспензии клеток <i>Foeniculum vulgare</i> с протопластами мезофилла <i>Daucus carota</i>	117
3.4.5.2 Слияние под действием электрического тока	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
Рекомендации производству	128
Список сокращений	129
Библиографический список	130

Введение

Актуальность темы исследования

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). Этот овощ часто используется в биотехнологических исследованиях в качестве модельного объекта, а методы культивирования *in vitro* открывают новые возможности для совершенствования аграрных технологий (Алжарамани и Монахос, 2025; Que et al., 2019).

Большинство современных сортов моркови образованы благодаря перекрестному опылению. При этом гибридные семена, ориентированные на повышение урожайности и качества, уже представлены на рынке, однако детального количественного анализа эффекта гетерозиса для моркови проведено пока не было (Corak et al, 2023). В селекции этой культуры широко применяется создание гибридов первого поколения (F1) на основе механизма цитоплазматической мужской стерильности ЦМС (Farinati et al., 2023; Broussard et al., 2017).

Создание аллоплазматической мужской стерильности у *Daucus carota* с помощью слияния протопластов обеспечивают важные научные достижения в селекции моркови, позволяя стабильно внедрять чужеродные цитоплазматические геномы в ядерный фон моркови (Bruznican et al., 2021; Xu et al., 2022). Этот метод позволяет индуцировать мужскую стерильность без зависимости от поддерживающих линий, преодолевая основное ограничение традиционных систем цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), при которых восстановление фертильности и сегрегация снижают эффективность селекции (Thakur et al., 2020; Chugh et al., 2020; Thi et al., 2023).

Соматическая гибридизация непосредственно объединяет цитоплазматические и ядерные геномы, обеспечивая стабильную передачу митохондриальной ДНК, ответственной за мужскую стерильность, что гарантирует генетическую стабильность в поперечных поколениях (Chugh et al.,

2020; Liu et al., 2024). Таким образом, полученные соматические гибриды моркови демонстрируют стабильное наследование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) в последующих поколениях независимо от генетического фона линий, с которыми они скрещиваются. Это указывает на то, что признак ЦМС эффективно закреплен в геноме гибрида и не подвергается влиянию взаимодействий ядерных генов других линий. Следовательно, устраняется традиционная необходимость использования линий-носителей для сохранения и размножения признака ЦМС. Такая стабильность упрощает селекционные программы, сокращая сложность и ресурсы, необходимые для поддержания мужской стерильности в производстве гибридной моркови.

Степень разработанности темы

Пионерский протокол по получению соматических гибридов из изолированных протопластных культур впервые был разработан на примере моркови (*Daucus carota* L.) (Krumbiegel, 1979). Данный метод с использованием протопластного слияния позволил интегрировать митохондриальную ДНК донорского вида в цитоплазму моркови, что создало условия для изучения механизмов мужской стерильности и селекции устойчивых аллоплазматических линий.

В дальнейшем протокол был адаптирован и модифицирован для улучшения эффективности слияния протопластов и повышения стабильности проявления мужской стерильности у различных генотипов моркови (Pelletier et al., 1995; Bruznican et al., 2021). Такие изменения включали оптимизацию условий культуры и отбора протопластов, использование индикатора успешного слияния, а также применение МТ-ДНК-анализа для подтверждения интеграции аллоплазмы и мониторинга гетероплазмии.

Ряд исследований сообщили о повышении частоты успешного создания аллоплазматических мужских стерильных линий благодаря усовершенствованиям в методике протопластного слияния и углубленному молекулярному анализу МТ-ДНК (Bhattacharya et al., 2024; Ranaware et al., 2023; Chugh et al., 2020). При этом некоторые генотипы моркови остаются с низкой

восприимчивостью к слиянию протопластов и требуют поиска дополнительных подходов для увеличения выхода стабильных мужских стерильных линий с помощью МТ-ДНК-анализа и новых биотехнологических методов.

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в создании аллоплазматической мужской стерильности у *D. carota* посредством слияния протопластов, продолжают исследования по оптимизации процессов и выявлению генетических факторов, влияющих на стабильность и наследуемость данного признака.

Цели и задачи исследования

Цель исследования – 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 поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Фенотипическое исследование цветочных структур и скрининг 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 исследования

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 $1,51 \times 10^5$ жизнеспособных протопластов с жизнеспособностью 95%, что в 13-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 исследования

Теоретическая часть исследования реализована через систематический аналитический обзор и интеграцию существующих научных данных, опубликованных в профильной литературе. Эмпирическая составляющая базируется на применении комплекса как стандартных, так и специализированных запатентованных методик, что обеспечило сбор репрезентативного массива экспериментальных данных. Для обеспечения объективности и достоверности результатов проведён углублённый статистический анализ, охватывающий все ключевые параметры. Детальное описание методологических подходов, включая конкретные протоколы и используемые инструменты, представлено в разделе «Материалы и методы».

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

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.

Апробация результатов

Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены на 8 международных конференциях.

1. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (Москва, 2022).
2. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2023).
3. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева (Москва, 2023).

4. 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),
5. Международная XXIII-й научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2023).
6. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 150-летию со дня рождения Миловича Александра Яковлевича (Москва, 2024).
7. Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 150-летию со дня рождения Миловича Александра Яковлевича (Москва, 2024).
8. International scientific conference "AGRONOMY - 2024" AgriScience (Москва, 2024).

Публикация 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.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 148 страницах, состоит из введения, основной части, заключения, библиографического списка, включающего 155 источника на иностранном языке, содержит 6 таблиц, 44 рисунков.

1 Обзор литературы

1.1 Значение моркови (*Daucus carota* L.) как овощной культуры

Морковь, *Daucus carota* L., входит в десятку наиболее экономически значимых овощных культур в мире (рис. 1), как по площадям производства, так и по рыночной стоимости (Que et al., 2019; Алжарамани и Монахос, 2023).

Производство моркови в России является развитым направлением. Общая площадь посевов моркови составляет 70 000 га, в том числе 30 000 га в фермерских хозяйствах (Leunov, 2017).

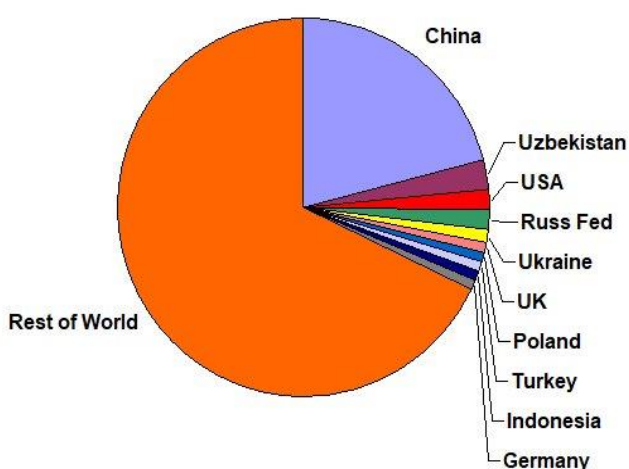


Рисунок – 1 Список десяти ведущих стран по производству моркови и репы (2018) источник FAO

Морковь — это двухлетний травянистый вид семейства Сельдереиные (Apiaceae), к которому также относятся сельдерей, пастернак, петрушка, кориандр, укроп, фенхель, анис и тмин. Корнеплоды моркови, развивающиеся из гипокотилия, обладают хорошей способностью к хранению. Большинство культурных сортов моркови являются диплоидными ($2n = 2x = 18$) (Que et al., 2019).

Сегодня улучшение свойств моркови включает в себя несколько частных и государственных научно-исследовательских программ по всему миру, которые работают в сотрудничестве с местными, региональными предприятиями, а также промышленными предприятиями мирового уровня. Государственные и частные селекционеры моркови, внедряющие современные технологии в классический

селекционный процесс, удовлетворяют потребности как производителей, так и потребителей (Simon et al., 2008).

1.2 Традиционная селекция моркови:

До середины 1900-х годов все сорта моркови были свободно опыляемыми (OP, open pollinated), как и большинство размножаемых семенных культур. Простейшей стратегией улучшения свободно опыляемых сортов является скрещивание или самоопыление отобранных элитных членов популяции для улучшения селекционируемого признака (признаков). По мнению Clerc et al., морковь не имеет системы самонесовместимости, поэтому самоопыление всегда возможно, но инбредная депрессия часто бывает значительной, если не тяжелой (Clerc et al., 2003). Селекционеры обычно направляют свои усилия на скрещивание относительно неродственных особей для объединения признаков из разных родительских линий, а затем отбирают формы, сочетающие признаки, привнесенные от обоих родителей. В случае моркови, чтобы обеспечить контролируемое опыление, скрещивание обычно проводят, помещая сетчатую клетку над цветками двух контрастных родителей и выпуская домовых мух (*Musca domestica* L.) или синих бутылочных мух (*Calliphora vomitoria* L.) для обеспечения опыления (Peterson and Simon, 1986). Два родителя могут быть отдельными растениями, но также могут включать по несколько растений из обоих родительских линий (Simon, 2021).

1.3 Ограничения технологий традиционной селекции

Сорта моркови с равномерными по размерам корнеплодов при сборе урожая является предпочтительным для рынков свежей и переработанной продукции, но может быть труднодостижимым для такой культуры, как морковь, со значительными различиями во времени прорастания даже в пределах одной партии семян. Данные проблемы могут быть усугубляться при высокой плотности посадки, типичной для выращивания такой культуры, как морковь. Разработка гибридной системы на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) стимулировала прогресс в достижении большей

однородности и жизнеспособности, в то же время вызывая повышенный интерес в отрасли производства семян овощей, учитывая наличие патентной защиты, которой обеспечиваются ЦМС-гибриды (Simon et al., 2000). Несмотря на ряд преимуществ, создание гибридной системы моркови на основе ЦМС занимает больше времени, чем селекция ОР, при этом для более узких зон выращивания или менее строгих требований рынка ОР проще и быстрее. Относительно медленная скорость развития селекционных популяций моркови (не более одного поколения в год) ограничивает классическую селекцию, особенно когда для подтверждения генотипов растений требуется тестирование потомства (Simon, 2021). Биотехнологии, и в частности селекция с помощью маркеров (MAS), могут сыграть свою роль в развитии как ОР, так и инбредных популяций, поскольку MAS можно использовать для выявления предпочтительных аллелей для признаков, которые трудно (устойчивость к большинству болезней) или медленно (время цветения) фенотипируются, а также для выявления гетерозиготных особей для удаления их из популяций, отбираемых по доминантным, просто наследуемым признакам. Самоопыление с последующим тестированием потомства отдельных растений является альтернативой MAS. Этот способ эффективен, однако он может потребовать проведения многочисленных самоопылений в течение нескольких поколений для создания как ОР-сортов, так и инбредных линий (Simon, 2021). В контексте стратегии геномного прогнозирования могут помочь в выявлении ценного селекционного материала с высокой плотностью данных о генотипах для прогнозирования фенотипов или селекционной ценности в генетических коллекциях. Применение геномного прогнозирования требует оценки определенных популяций в потенциальном контексте селекции. Геномная селекция, возможно, позволит выявить более ценные сорта, не требуя обширных полевых исследований. Таким образом, этот метод дает результаты, аналогичные фенотипическому отбору, при меньших затратах на фенотипирование. Наконец, оценка популяции в целевой среде может иметь стратегическое значение для некоторых признаков (Corak et al., 2023).

1.4 Классификация типов мужской стерильности

Kalloo (1988) подразделял мужскую стерильность на две основные группы (Kalloo, 1988), генетическую (спонтанную или индуцированную) и негенетическую (индуцированную). По фенотипическому признаку генетическая мужская стерильность подразделяется на три типа: спорогенная, структурная и функциональная. Аналогично, негенетическая мужская стерильность делится на химическую, физиологическую и экологическую. Далее, генотипически генетическая мужская стерильность подразделяется на ядерную, цитоплазматическую и ядерно-цитоплазматическую.

1.4.1 Ядерная мужская стерильность ЯМС

ЯМС отмечена примерно у 175 видов растений, включая ключевые овощные культуры. Как следует из названия, этот тип мужской стерильности контролируется геном(ами) ядра. Большинство возникающих в природе или индуцированных мужских стерильных мутантов являются рецессивными по своей природе, за некоторыми исключениями, такими как кочанные овощи (например, капуста и брокколи) и генетически трансформированные мужские стерильные линии. Возникновение преимущественно рецессивной мужской стерильности ясно указывает на то, что ЯМС является результатом мутации в каком-либо гене (генах), контролирующем микропорогенез (процесс развития пыльца), развитие тычинок или микрогаметогенез (процесс развития мужских гамет), и, соответственно, фенотип мутантов ЯМС может быть различным (Dhall, 2011). Все трансгенные мужские стерильные линии, созданные к настоящему времени, являются ЯМС, поскольку они созданы путем трансформации генных конструкций, вызывающих мужскую стерильность, в ядерном геноме. Некоторые мутанты, производящие пыльцу, не способны к самооплодотворению либо из-за отсутствия дегисценции пыльца, либо из-за их особой морфологии цветка. Такие мутанты называют функционально стерильными. Это, например, генотипы с нераскрывающимися пыльниками или вытянутым рыльцем у томата, баклажана и некоторых других овощей (Mishra and Kumari, 2018).

Использование ЯМС: Первым шагом в использовании системы ЯМС является размножение семян мужской стерильной линии, что невозможно путем самоопыления, поскольку пыльца либо нежизнеспособна, либо не производится. Обычно используемый моногенный рецессивный ЯМС (msms) поддерживается путем обратного скрещивания с гетерозиготной изогенной линией (Msms) для получения мужской стерильности. Поэтому в полевых условиях производства гибридных семян 50% мужских фертильных растений (Msms) необходимо идентифицировать и удалять до того, как они зацветут (рис. 2). Таким образом, этап идентификации мужских стерильных/фертильных растений в гибридном семеноводстве очень важен (Dhall, 2011).

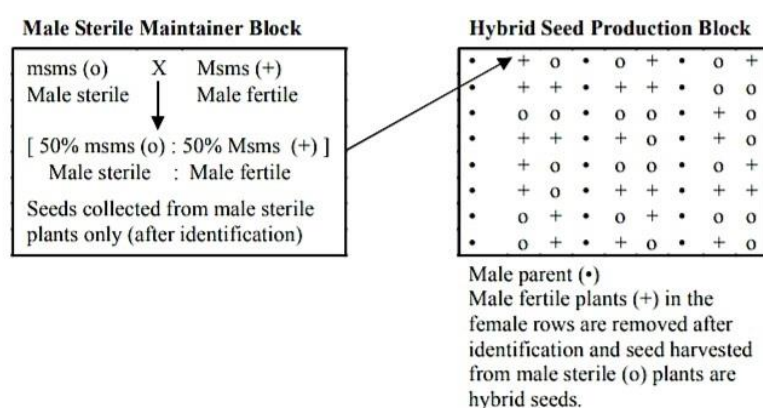


Рисунок – 2 Общая схема производства гибридных семян с использованием моногенного рецессивного ЯМС (Dhall, 2011)

Ограничения технологии ЯМС: Из-за большей трудоемкости процесса обнаружения и отсутствия подходящих маркерных генов среди овощных культур ЯМС используется в коммерческих целях только для чили и мускусной дыни. Более того, для ряда культур, например, томата, баклажана, гороха и т.д., которые являются в значительной степени самоопыляемыми, свободное скрещивание оказывается невозможным, что приводит к плохому урожаю семян и/или плодов. Этот метод может стать популярным на практике только в том случае, если будут найдены подходящие насекомые-опылители или другие средства для повышения процента перекрестного опыления (Dhall, 2011; Mishra and Kumari, 2018).

1.4.2 Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС)

Данный тип мужской стерильности определяется цитоплазмой. Поскольку цитоплазма зиготы происходит в основном из яйцеклетки, потомство таких мужских стерильных растений всегда будет стерильным. Цитоплазматическая мужская стерильность может быть легко передана сорту путем использования этого сорта в качестве опылителя (повторяющегося родителя) в последующих поколениях программы беккрасса. После 6-7 беккроссов ядерный генотип мужской стерильной линии будет практически идентичен генотипу рекуррентного (Dhall 2011; Mishra and Kumari, 2018).

Использование ЦМС: Цитоплазматическую мужскую стерильность можно поддерживать путем скрещивания мужски стерильной линии (линия А) с изогенной линией закрепителем стерильности, используемым в качестве повторяющегося родителя в программе беккрасса, поскольку ядерный генотип опылителя идентичен генотипу новой мужской стерильной линии (Mishra and Kumari 2018). Основной метод использования цитоплазматически мужски стерильного родителя для производства гибридных семян показан на (рис. 3). Цитоплазматическая мужская стерильность может быть использована для производства гибридных семян в тех овощных культурах, где вегетативная часть имеет экономическую ценность, например, в луке, моркови, редисе, колеусе и т.д. Но в тех овощных культурах, где экономическую ценность представляют семена, таких как томат, чили, дыня и т.д., она не используется, поскольку гибридное потомство будет мужски стерильным (Dhall, 2011).

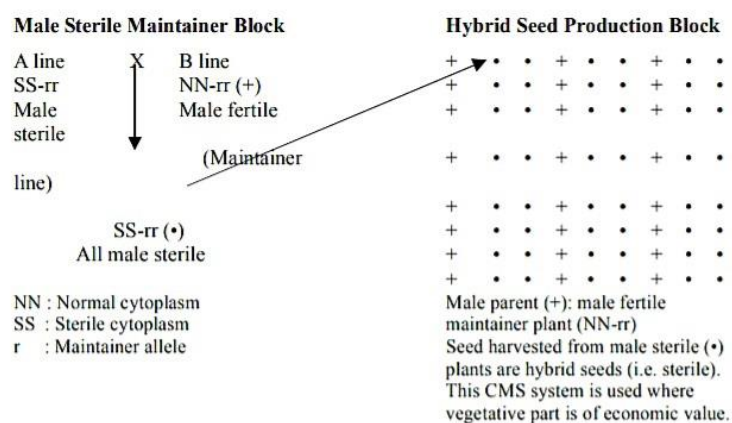


Рисунок – 3 Общая схема производства гибридных семян с использованием ЦМС (Dhall, 2011)

Гибридные семена, полученные на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), являются генетически однородными по сравнению с семенами, полученными в результате свободного переопыления (Singh et al., 2023). Цитоплазматическая мужская стерильность является эффективным инструментом контроля опыления и позволяет селекционерам усилить гибридизацию и повысить продуктивность (Singh et al., 2015), а также улучшить агрономические характеристики и выход, поскольку ЦМС облегчает создание улучшенных сортов путем контролируемой селекции. Хотя цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) сама по себе не обеспечивает устойчивость культур к заболеваниям, ее интеграция в программы гибридной селекции открывает путь к созданию гибридов, наделенных как мужской стерильностью, так и устойчивостью к заболеваниям. Благодаря стратегическим скрещиваниям между линиями ЦМС и устойчивыми к болезням сортами селекционеры могут использовать генетические механизмы, регулируемые ЦМС, для усиления признаков, связанных с устойчивостью к болезням (Charagain, 2024).

Ограничения ЦМС: Данная техника имеет определенные нижеперечисленные ограничения:

1. Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) чувствительна к факторам окружающей среды, например, линия может быть полностью стерильной в одном наборе условий и частично фертильной в другом наборе условий. Это явление может привести к самоопылению и примеси sibсовых семян в гибридных семенах (Yadav and Rai, 2013). Необходимы дополнительные исследования для полного понимания взаимодействия между факторами окружающей среды и генетикой в производстве гибридов на основе ЦМС.

2. Некоторые болезни или нарушения связаны с определенным типом цитоплазмы, что приводит к генетической уязвимости. Так, например, Т-цитоплазма ассоциирована с южным листовым поражением кукурузы (Dhall, 2011).

3. Непрерывное включение небольшого количества цитоплазмы родительского мужского организма при каждом беккроссе во время его

проведения может привести к частичному или полному нарушению мужской стерильности (Dhall, 2011).

4. Не все виды сельскохозяйственных культур естественным образом обладают мутациями ЦМС или необходимыми генами восстановления фертильности. Альтернативные варианты генов восстановления фертильности у различных культур ограничены (Liu et al., 2002), что сужает возможность скрининга сильных гетерозисных комбинаций (Guo et al., 2006).

1.4.3 Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность (ЯЦМС)

Если выявлен доминантный аллель-восстановитель фертильности (расположенный в ядерном геноме), обеспечивающий фертильность пыльцы в системе цитоплазматической мужской стерильной линии, ее принято называть ядерно-цитоплазматической мужской стерильностью (Mishra and Kumari, 2018). Ген восстановителя фертильности Rf (restoring fertility) чаще всего является доминантным. Фактор стерильности определяется взаимодействием ядерных генов и цитоплазмы, но ни один из них в отдельности не может контролировать стерильность. Данный тип мужской стерильности отмечен у моркови, лука, сахарной свеклы, чили перца, перца сладкого, рапса и других культур. Наряду со стерильной цитоплазмой, стерильность определяется одним рецессивным геном (msms) у лука, редиса, чили и сладкого перца; двумя рецессивными генами (xx zz) – у свеклы и доминантным геном (Ms ms или Ms Ms) – у моркови. Однако этот тип стерильности оказывается нестабильным из-за наличия модифицирующих генов (Mishra and Kumari, 2018).

Ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность может поддерживаться путем скрещивания цитоплазматически мужски стерильной линии (Srfrf) или линии А с линией опылителем (Nrfrf), используемым в качестве рекуррентного родителя в программе беккрасса, поскольку ядерный генотип опылителя идентичен генотипу новой мужски стерильной линии (рис. 4). Такая мужская фертильная линия (Nrfrf) известна как линия закрепитель стерильности или линия В, поскольку она используется для поддержания мужски стерильной линии (Dhall, 2011).

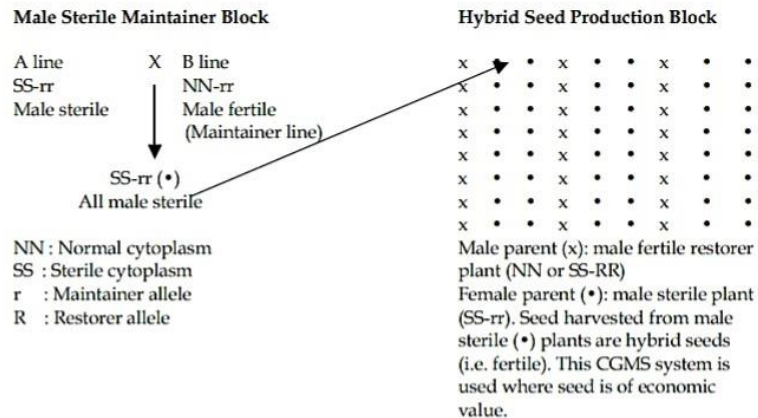


Рисунок – 4 Общая схема производства гибридных семян с использованием ЯЦМС (Dhall, 2011)

Использование ЯЦМС: для производства гибридных семян 2-3 ряда линии А (Srfrf) чередуются с 1 рядом линии С, которая, как правило NRfRf. Семена собираются с линии А для использования в качестве коммерческих гибридных семян. Линия С может иметь генотипы NRfRf, Nrfrf, SRfRf. Гибрид, созданный с использованием закрепителя стерильности, будет стерильным и может быть использован там, где семена не являются коммерческим продуктом. Основное преимущество системы ЯЦМС перед ядерной мужской стерильностью заключается в том, что мы можем получить 100% мужские стерильные растения для прямого использования в качестве материнских (Dhall, 2011).

Ограничения ЯЦМС: Недоступность ЯЦМС у многих культур и их диких родственников; необходимость аллеля восстановителя фертильности у растений с используемой генеративной сферой в качестве товарного органа; нежелательный плеiotропный эффект стерильной цитоплазмы агрокачества; нарушение мужской стерильности в определенной среде; очень нестабильная стерильная цитоплазма в некоторых случаях; плохая способность к перекрестному опылению цветков растений со стерильной цитоплазмой из-за измененной морфологии и технические сложности, связанные с производством семян и поддержанием родительских линий (Dhall 2011; Mishra and Kumari, 2018).

1.5 Чувствительная к условиям окружающей среды мужская стерильность

Это уникальная система мужской стерильности, в которой экспрессия гена мужской стерильности и фертильности растений контролируется факторами окружающей среды. В данной системе ген мужской стерильности экспрессируется только в определенных условиях, как правило, при низкой или высокой температуре, коротком или длинном фотопериоде, переменной интенсивности света, различных почвенных стрессах или их определенных комбинациях (Dhall 2011; Mishra and Kumari, 2018). Такая ситуация может возникнуть как в генетических, так и в цитоплазматических системах ядерной мужской стерильности. Линии EGMS (чувствительной к условиям окружающей среды мужской стерильности) были зарегистрированы у нескольких овощных культур, таких как капуста, брюссельская капуста, брокколи, перец (чили и сладкий перец), томат и морковь. Большинство из них, однако, ранее были идентифицированы как линии нормальной генетической мужской стерильности (Kumar et al., 2000). Преобразование мужской стерильности в фертильность и ее обратное развитие – сложное генетическое явление, и для его лучшего понимания необходимы дополнительные исследования на уровне геномики и физиологии.

1.6 Восстановление фертильности

Восстановление мужской фертильности у гибридов с ядерно-цитоплазматической мужской стерильностью является неотъемлемой частью любой технологии гибридного семеноводства. При скрещивании линии восстановителя фертильности с мужски стерильной линией доминантный ядерный ген Rf преодолевает негативные последствия дефектного митохондриального генома. Ген Rf отвечает за выработку белков, которые восстанавливают повреждения и делают растение фертильным. Сообщалось, что у большинства сельскохозяйственных культур фертильность пыльцы контролируют один или два доминантных гена-восстановителя фертильности

(Saxena et al., 2011). Кроме того, сообщалось, что один из основных генов, восстанавливающих фертильность, снижает уровень белка, вызывающего стерильность, на 80 %. Восстановление фертильности также было связано с генами, кодирующими белки с пентатрикопептидными повторами (Saxena and Hingane, 2015).

1.7 Преимущества ЦМС перед другими системами размножения

У моркови гибриды F1 ценны благодаря равномерному созреванию, высокой ранней и общей урожайности, лучшее качество исполнения в отношении его цвета, а также устойчивости к насекомым-вредителям, болезням и неблагоприятным погодным условиям. Эффективный, надежный и установленный метод производства семян F1 без примесей семян от самоопыления от каждого родителя является жизненно важным. Ручной метод эмаскуляции и опыления моркови не подходит для коммерческого уровня из-за несовместимости размеров и структуры цветков (Chugh et al., 2020).

1.8 Молекулярные механизмы, ответственные за ЦМС

Фенотип МС неоднократно спонтанно возникал в природных популяциях. Он возникает в результате естественных мутаций, связанных с перестройкой митохондриального генома (мтДНК). Как правило, эти мутации возникают в результате внутригеномных событий гомологичной или негомологичной рекомбинации, которые создают новые открытые рамки считывания (ORF) (Dufay et al., 2007). Исследователям Shandhu et al., в 2007 г. удалось воспроизвести появление ЦМС у фертильных растений после подавления экспрессии ядерного гена Msh1, который участвует в контроле рекомбинации в митохондриальной ДНК растений (Sandhu et al., 2007). Перестройки, вызывающие ЦМС, могут находиться в митохондриях растений в низкой стехиометрии, но могут увеличивать свою концентрацию за счет субстехиометрического сдвига, позволяя проявляться фенотипу ЦМС (Sandhu et al. 2007; Oshima et al., 2010). Несколько исследований показали существование

ЦМС ORF в фертильных линиях, хотя и в крайне низких концентрациях (Kim et al., 2019).

Молекулярные механизмы, объясняющие состояние ЦМС, далеко не полностью изучены главным образом потому, что каждая система ЦМС, по-видимому, уникальна с точки зрения митохондриальных генов, связанных с состоянием мужской стерильности (Garcia et al., 2019). В действительности, существуют линии ЦМС, широко используемые в селекционных программах, в которых была разработана специфическая линия-восстановитель, но идентичность гена, ответственного за состояние мужской стерильности, остается неизвестной (Huang et al., 2015). Механизм цитоплазматической мужской стерильности варьирует от растения к растению. Если посмотреть на разрушающиеся пыльники нескольких культур, таких как рис, кукуруза, свекла и редис, то в них практически не было пролина (Charagain, 2024).

Выявление молекулярной основы ЦМС требует использования различных стратегий. Одна из них заключается в поиске гена или генов, ответственных за ЦМС, путем прямого сравнения мтДНК. Предложение гена-кандидата ЦМС путем изучения последовательностей мтДНК в этих сильно перестроенных геномах растений является особенно сложной задачей. Однако бывают случаи, когда предложенный в качестве кандидата ген является практически единственным различием между митохондриальными последовательностями нормальных и ЦМС-линий (Kim et al., 2019). В этих случаях мутация или перестройка, которая привела к появлению фенотипа ЦМС, скорее всего, была очень недавним событием в мтДНК (Luo et al. 2013; Garcia et al., 2019). В системах ЦМС, кодируемых митохондриями, мужская стерильность часто обусловлена запрограммированной гибелью клеток тапетума, и увеличение числа митохондрий не сможет обеспечить производство энергии в момент образования пыльцы (Balk and Leaver, 2001).

1.9 Цитоплазматическая мужская стерильности моркови

Развитию гибридов у моркови способствовала цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), которая, согласно Riggs (1987), бывает двух типов. (i) Тип «браун» или коричневого пыльника, при котором пыльники дегенерируют и сморщиваются. Данный тип основан на S-цитоплазме и по крайней мере двух рецессивных генах с комплементарным действием. (ii) Петалоидный тип, при котором пять дополнительных лепестков заменяют пыльники (Riggs, 1987). Тип основан на S-цитоплазме и по крайней мере двух доминантных генах с комплементарным действием (Huang et al., 2015) (рис. 5). При коммерческом выведении гибридов чаще всего используются стерильность типа «петалоид», в меньшей степени тип «браун». Если бы были доступны генетически и экологически стабильные стерильные типы коричневых пыльников, то они были бы предпочтительнее петалоидных из-за их более высокого потенциала урожайности семян.

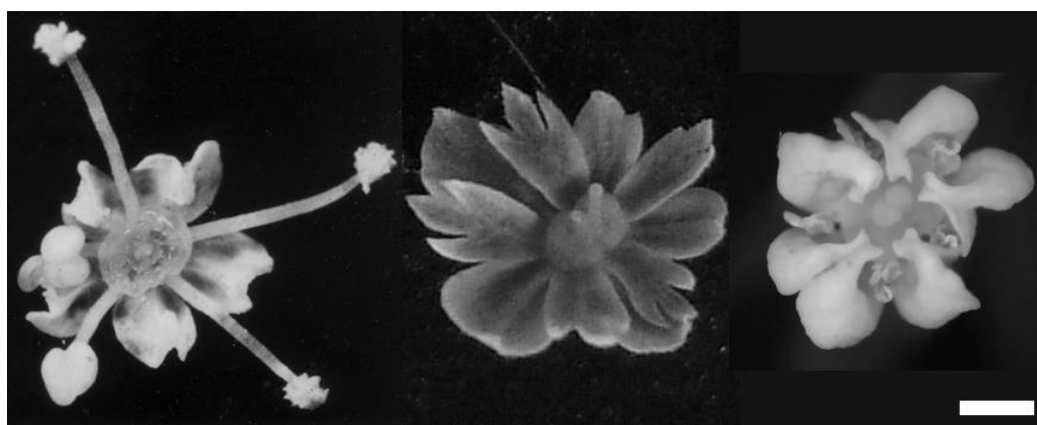


Рисунок – 5 Мужски фертильный (слева), петалоидный мужски стерильный (в середине) и тип «браун» стерильные (справа) цветки моркови. Белая полоса = 1 мм (Prohens and Nuez, 2008)

1.10 Эволюция митохондриальной ДНК и ЦМС у моркови

Митохондрии отвечают за обеспечение жизненных процессов энергией в молекулярной форме АТФ и поэтому их обычно называются энергетическими фабриками клеток. Митохондрии растений также имеют отношение к такому распространенному явлению, как цитоплазматическая мужская стерильность,

которая имеет агрономическое значение для различных видов сельскохозяйственных культур. Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – сложный признак, на который могут влиять модели эволюции митохондриального генома, а также межгеномный перенос генов между органеллярным и ядерным компартментами растительных клеток (Chen et al., 2017).

Петалоидная цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – это наследуемая по материнской линии потеря мужской фертильности из-за полного превращения тычинок в лепесткоподобные органы. Линии ЦМС широко используются в селекции моркови. Петалоидная ЦМС - идеальная модель для изучения митохондриально-ядерного взаимодействия (Liu et al., 2019). Некоторые ранние исследования были посвящены описанию механизма ЦМС моркови. Например, Nakajima et al., обнаружили, что в линиях моркови с ЦМС происходит перестройка митохондриального генома (Nakajima et al., 1999). Кроме того, было обнаружено, что ген *orfB*, связанный с митохондриальным геном моркови, тесно ассоциирован с ЦМС петалоидов (Nakajima et al., 2001). Однако более поздние исследования показали, что *atp8*, скорее всего, был неправильно идентифицирован как ORFB в вышеупомянутом исследовании, и указали, что экспрессия *atp8* не была напрямую связана с ЦМС петалоидов (Robison and Wolyn, 2006). Сообщалось, что ORF *atp9* в петалоидном варианте на 13 аминокислот длиннее, чем *atp9* в соответствующем нормальном варианте из-за точечной мутации, и экспрессия *atp9*, соответствующего петалоидному варианту, выше (Marek et al., 2014). Недавно явление вставки митохондриальной и ядерной ДНК в пластидный геном было выявлено у моркови (Chen et al., 2017). Известно, что ЦМС в основном вызывается химерами митохондриальных генов ORF, однако механизм ЦМС петалоидов моркови до сих пор неясен (Liu et al., 2019).

Ген субъединицы 9 АТФазы F₀-F₁ митохондрий моркови был выделен как из мужски стерильной петалоидной линии (*atp9-1*), так и из нормальной фертильной цитоплазмы (*atp9-3*). Позиция, занимаемая в *atp9-3* стопкодоном

ТАА, в случае *atp9-1* заменена триплетом САА, кодирующим глутаминовую кислоту, что делает ORF этого гена на 13 аминокислотных остатков длиннее, чем у *atp9-3*. 3' конец гена *atp9-3* фланкирован прямым повтором длиной 42 п.н. Последовательность повтора также присутствует на 3' конце *atp9-1*. Было обнаружено, что усеченная и предположительно неактивная версия *atp9* (*atp9-2*) присутствует в цитоплазмах независимо от обусловленного ими фенотипа фертильности. Ген *atp9-1* из цитоплазмы петалоидов оказался котранскрибируемым с геном, кодирующим 5S рРНК, и ядерный фон влиял на накопление соответствующего транскрипта (Chen et al., 2017).

1.11 Применение биотехнологий для улучшения моркови

1.11.1 Регенерация *in vitro* и микроразмножение

Морковь рассматривается как модельный организм для культуры тканей растений, о котором Steward et al., были сделаны первые сообщения о тотипотентности любого организма (Steward et al., 1958). Благодаря способности легко регенерировать в культуре тканей, морковь использовалась для оценки возможности селекции *in vitro*, особенно на устойчивость к болезням (Grzebelus et al., 2012), а также на толерантность к антибиотикам и аналогам сахара (Stommel and Simon, 1989). Морковь также является модельным растением для культуры протопластов, на которой были получены первые примеры регенерации моркови, а также усовершенствованные протоколы (Grzebelus et al., 2012) для поддержания роста протопластов моркови в присутствии фильтратов грибковых заболеваний (Grzebelus et al., 2013). Соматическая гибридизация протопластов моркови была использована для получения полиплоидных растений моркови, а также для слияния протопластов культурной моркови с ее диким родственником, *Daucus carota* L. ssp. *capillifolius* (Gilli) Arbizu (Mackowska et al., 2023). В попытке слияния протопластов моркови с неродственными растениями сообщалось о слиянии протопластов моркови с протопластами женьшеня (Han et al., 2009), табака (Dudits et al., 1987).

Культура тканей репродуктивных органов моркови использовалась для культивирования неоплодотворенных яйцеклеток (Kielkowska and Adamus, 2010) и получения гаплоидов в культуре пыльников (Kiszczak et al., 2017). Возможность получения гаплоидов в культуре пыльников моркови не была широко применима к многочисленным генотипам (Li et al., 2013). Для получения гаплоидов из более широкого спектра генетических источников моркови в последнее время предпринимаются усилия по созданию гаплоиндуктора на базе модифицирования центромерного гистона CENH3 (Dunemann et al., 2019).

Создание искусственных семян было успешно проведено на моркови с использованием соматических эмбрионов, выращенных в суспензионных культурах, которые были инкапсулированы альгиновой кислотой (Latif et al., 2007). Идея искусственных семян привлекательна тем, что представляет собой альтернативу относительно медленному процессу производства семян моркови, а также тем, что позволяет по сути клонировать отдельное растение, что, как можно ожидать, приведет к получению более однородного урожая. Искусственно полученные семена могут храниться при температуре холодильника, иногда с последующей обработкой сушкой, и впоследствии успешно выращиваться. О коммерческом полевом применении искусственных семян моркови не сообщалось (Simon et al., 2008).

1.11.2 Генетическая трансформация и редактирование генов

Морковь широко используется в исследованиях по переносу генов благодаря эффективной пролиферации клеток и тканей в условиях *in vitro* (Baranski, 2008). Морковь была успешно генетически трансформирована с помощью различных методов: поглощения протопластов, электропорации и бомбардировки микрообъектами (Deroles et al., 2002). Барански и Лукасевич сообщили об оценке предполагаемых генов устойчивости на предмет их эффективности в борьбе с 13 различными заболеваниями моркови (Baranski and Lukasiewicz, 2019). Недавно оптимизация CRISPR/Cas9 с Atecas9 для мутации F3H была продемонстрирована на моркови для успешного сайт-направленного мутагенеза (Chodacka et al., 2018). Гены DcPDS и DcMYB113 были

отредактированы в оранжевой и пурпурной моркови соответственно для устранения пигментации с помощью четырех кассет sgRNA, что продемонстрировало стабильность растений моркови с отредактированными генами (Xu et al., 2019).

1.11.3 Молекулярная селекция

У моркови с помощью исследований сцепления были картированы важные хозяйственные признаки, включая рост, морфологию корнеплода, качество корнеплода, ядерные гены восстановители ЦМС, мужскую стерильность, признаки устойчивости к болезням и вредителям. Идентификация геномных регионов, соответствующих экономически важному признаку, с помощью молекулярных маркеров помогает селекции сельскохозяйственных культур. Исследования генетического разнообразия с использованием молекулярных маркеров были проведены (Jhang et al., 2010; Kushlaf, 2011). Были выявлены различные Лocusы количественных признаков ЛКП, распределенные по геному моркови для полигенных признаков, таких как содержание каротина, антоцианов и летучих терпеноидов (Simon, 2019). Selvakumar et al., сообщили о геномных повторах простых последовательностей (GSSR) и SSR-маркерах на основе концевых последовательностей BAC (BSSR) для идентификации и точного отбора моркови с высоким содержанием антоцианов в популяции F2 (Selvakumar et al., 2022).

1.12 Протопласты как интегрированная система

1.12.1 Тотипотентные системы протопластов

Термин "тотипотентный" имеет два принципиально разных толкования: (i) способный развиваться в полноценный организм или (ii) способный дифференцироваться в любые типы клеток организма (Condic, 2014). Считается, что соматический эмбриогенез является окончательным доказательством тотипотентности соматических клеток растений. Действительно, отдельные клетки, образующие зародыши (эмбриогенные клетки), по определению являются тотипотентными, поскольку зародыши могут автономно развиваться

до целых растений. Как и органогенез, соматический эмбриогенез нуждается в индукции. Это означает, что, хотя некоторые соматические клетки могут (повторно) обрести тотипотентность в соответствующих условиях, сами по себе они не являются тотипотентными (Fehér, 2019). Более того, формирование соматического эмбриона не обязательно включает ни дедифференцированные соматические, ни тотипотентные клетки. В таких процессах, как каллусообразование и органогенез, часто наблюдается инициация эмбрионов из клеток, окружающих жилки (часто называемых прокамбиальными клетками) (Rose et al., 2010; de Almeida et al., 2012). У моркови образование соматических зародышей можно проследить по отдельным клеткам или небольшим кластерам клеток периваскулярного происхождения в свежей жидкой культуре эксплантов гипокотилля. В присутствии ауксина (2,4-D) эти клетки формируют проэмбриогенные клеточные массы (РЕМ) как переходный этап к эмбриогенезу (de Almeida et al., 2012).

1.12.2 Исходный материал для выделения протопластов

В культуре протопластов протопласты могут быть выделены из любой части растения, включая листья, верхушки побегов, корни, колеоптиль, гипокотиль, черешки, эмбрионы, пыльцевые зерна, каллусы и суспензии клеток; все они являются потенциальными органами для выделения протопластов. Наиболее надежным источником протопластов являются клетки мезофилла листа, из которых можно выделить большое количество относительно однородных клеток (Aljaramany et al., 2024). Последнее исследование Sun et al., эффективно показывает, как состояние метилирования ДНК и возраст листьев строго контролируют тотипотентность протопластов, причем основной акцент делается на эпигенетическом состоянии клеток во время репрограммирования (Sun et al., 2019). Преимущество выделения протопластов из проростков заключается в том, что в течение нескольких дней после прорастания семян протопласты могут быть выделены из радикул, тканей семядолей, корней и корневых волосков. Несмотря на увеличение выхода протопластов из семядолей по мере старения проростков, их жизнеспособность снижалась. Одновременные

исследования позволили улучшить выделение протопластов из семядолей бобовых. Аналогичным образом было обнаружено, что семядоли проростков белого люпина, культивируемых *in vitro*, дают больший выход протопластов, чем листья, гипокотиль и корни (Aljaramany et al., 2024). До настоящего времени суспензионные культуры каллусных клеток обычно использовались в качестве донорского материала протопластов в исследованиях, особенно для внутривидовой и межвидовой соматической гибридизации (Grzebelus et al., 2012). Был описан высокоэффективный и доступный метод выделения протопластов из каллусной ткани, индуцированной из семян риса. Этот подход использует донорский материал, который не требует больших ресурсов и легко размножается. Он представляет собой выгодную и полезную платформу для различных исследований методом трансфекции *in vivo* на рисе (Poddar et al., 2020). Несмотря на то, что суспензионные культуры являются отличным источником протопластов благодаря их высокой эмбриогенной способности, создание и поддержание суспензионных культур является трудоемким и длительным процессом, обычно требующим нескольких недель по сравнению со временем, необходимым для индукции каллуса. Стоит отметить, что на процесс выделения протопластов значительное влияние оказывают тип исходного материала, состав клеточной стенки, наличие дополнительного внешнего слоя и связующий материал между клетками (Aljaramany et al., 2024).

1.12.3 Методы выделения и изоляции протопластов

Методы выделения протопластов можно разделить на два основных типа: механическое отделение и ферментативное разложение клеточной стенки. Механический способ включает помещение клеток в гипертонический раствор, вызывающий плазмолиз и отделение плазматической мембраны, что способствует освобождению протопластов из растительной ткани (Adedeji et al., 2020). Этот метод наиболее эффективен для крупных клеток с большими вакуолями, таких как клетки луковичных чешуй, моркови и свёклы. Основным ограничением механического способа является снижение жизнеспособности

протопластов из-за выделения веществ из повреждённых клеток (Chen et al., 2023).

Ферментативный метод, напротив, широко применяется для выделения протопластов (Zhang et al., 2022). Суть метода в использовании комплекса ферментов — целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы — которые разрушают основные компоненты клеточной стенки, позволяя отделить отдельные клетки (Zhou et al., 2021). В частности, пектиназа и диссоциирующие ферменты направлены на расщепление молекул пектина, способствуя разделению соседних клеток. В процессе выделения протопластов принято смешивать целлюлазу и пектиназу (Shrestha et al., 2021). Пектиназа разрывает пектин, связывающий соседние клетки, что облегчает их разделение. Обычно для достижения максимального эффекта ферменты смешивают: сначала пектиназу, а затем целлюлазу, которая продолжает расщепление клеточной стенки до освобождения целостных протопластов. Такой метод позволяет получать большое количество жизнеспособных протопластов и применяется в различных биотехнологических исследованиях (Chen et al., 2023).

1.12.4 Предварительная обработка ферментативно выделенного растительного материала

Этап предварительной обработки растительного материала имеет решающее значение для улучшения проникновения ферментов в клеточную стенку, что значительно способствует увеличению выхода протопластов. Существует несколько способов такой обработки, каждый из которых направлен на повышение эффективности изоляции. Темновая инкубация заключается в выдерживании растительного сырья в темных условиях в течение нескольких часов (Chen et al., 2023). Это помогает повысить жизнеспособность будущих протопластов, снижая риск фотоповреждений, которые могут возникнуть при воздействии света во время выделения.

Обработка перед отделением плазматической мембраны (Kang et al., 2020) включает погружение ферментативно обработанного материала в промыточный раствор для протопластов, содержащий маннитол определенной концентрации

или их смеси. Погружение может осуществляться как без движения, так и с контролируемым перемешиванием в течение установленного времени. Основная задача данного этапа – ускорение отделения плазматической мембраны хлоропластов (Adedeji et al., 2020), что облегчает последующую экстракцию протопластов и способствует значительному увеличению их выхода.

Низкотемпературная обработка предполагает выдерживание растительного материала при температуре около 4 °С, обычно в холодильнике, и часто сочетается с темновой инкубацией. Главной целью является защита протопластов от повреждений и улучшение их количества и жизнеспособности после выделения. В совокупности эти методы предварительной обработки оптимизируют условия для ферментативного воздействия, что положительно сказывается на общем количестве и качестве полученных протопластов (Chen et al., 2023).

1.12.5 Факторы, влияющие на получение протопластов

Эффективность получения протопластов зависит от ряда важных факторов, которые существенно влияют на общий выход и качество результата. Механические методы, как правило, ограничены использованием тканей с высокой степенью вакуолизации, что приводит к относительно низкому выходу протопластов. В отличие от них, ферментативные методы существенно зависят от выбора ферментов, их концентрации, осмотического давления, температуры и времени ферментативной обработки, а также от способа очистки полученного материала (Du et al., 2023). Основными ферментами для разрушения клеточной стенки служат целлюлаза, гемицеллюлаза и пектиназа, которые подбираются в соответствии с составом клеточной стенки. Целлюлаза способна гидролизовать сложные молекулы целлюлозы, расщепляя их до более простых сахаров, в то время как гемицеллюлазы обеспечивают гидролиз гемицеллюлозы (Souza et al., 2021). Пектиназа эффективно расщепляет пектин, облегчая отделение клеток друг от друга путем гидролиза пектина до β -галактуронида. Выбор конкретных ферментов для диссоциации зависит от вида растений и типа тканей, что требует разработки специализированных протоколов для каждого случая (Qiu et al.,

2020). Благодаря этим особенностям ферментативный метод остается наиболее предпочтительным и широко используемым способом выделения протопластов (Du et al., 2023).

Кроме того, на успешность выделения протопластов влияют такие параметры, как концентрация ферментов, условия осмотического давления, а также температура и длительность обработки. Поскольку подбор ферментного состава должен принимать во внимание биологические характеристики растения и его тканей, ферментативный подход остается лучшим выбором благодаря своей универсальности и эффективности (Chen et al., 2023).

1.12.6 Очистка протопластов

После окончания ферментативной обработки растительного сырья с применением ферментного раствора образуется гетерогенная смесь биологических компонентов. В эту смесь входят не только целые и физиологически активные протопласты, но и остатки ферментного раствора, непереваренные и поврежденные клетки, а также значительное количество клеточного мусора и органелл. Наличие таких разнообразных элементов существенно влияет на физиологическое состояние протопластов и дальнейшие возможности их использования, что делает этап очистки крайне важным и сложным. Основной целью очистки является получение чистой и жизнеспособной популяции протопластов с сохранением их структурной целостности, пригодной для последующих исследований и применения.

Первым этапом очистки является удаление крупных частиц, таких как остатки клеточной ткани и непереваренные клеточные сгустки. Для этого смесь фильтруют через сито с размером ячеек обычно от 40 до 100 мкм (Ren et al., 2021). Такая фильтрация эффективно удаляет крупные нежелательные примеси, оставляя смесь, содержащую как протопласты, так и мелкие частицы мусора, которые затем можно удалить на последующих этапах очистки.

В настоящее время для очистки протопластов применяются различные методы, каждый из которых обладает своими уникальными достоинствами и ограничениями. Среди них выделяют седиментацию, флотацию и межфазные

методы. Седиментация, или центробежное осаждение, основана на разнице удельного веса компонентов. После предварительной фильтрации, удаляющей крупные частицы, смесь подвергается центрифугированию, в ходе которого протопласты оседают на дно пробирки в растворе с контролируемыми осмотическими условиями. Несмотря на то, что такой способ может вызывать некоторый механический стресс, он обеспечивает высокий выход протопластов. Метод флотации использует разницу в плотности между протопластами и насыщенными растворами сахарозы — при центрифугировании протопласты всплывают на поверхность, а остатки тканей оседают вниз. Этот метод отличается высокой степенью очистки и сохранением структурной целостности клеток, хотя обычно сопровождается более низким выходом протопластов (Kang et al., 2020).

Межфазный, или интерфазный метод (Jeong et al., 2021), базируется на создании двух растворов с разной осмотической концентрацией, формирующих область с определённой плотностью, в которой концентрируются протопласты. Это позволяет эффективно отделять их от примесей. Таким образом, очистка протопластов — важный и непростой этап, критически необходимый для получения высококачественных клеточных суспензий, пригодных для широкого спектра исследований. Выбор конкретного метода зависит от целей и требований эксперимента, при этом каждый способ имеет свои особенности и преимущества.

Правильный выбор метода очистки является ключевым фактором успеха в последующих научных и прикладных работах с протопластами (Chen et al., 2023).

1.12.7 Выход и жизнеспособность протопластов

Процесс выделения протопластов может зависеть от множества факторов, включая активность ферментов, особенности операционных процедур и связанные с ними условия, что в некоторых случаях может приводить к повреждению или разрушению протопластов. Поэтому количество и качество полученных на этом этапе протопластов имеют первостепенное значение. Характеристики выделенных протопластов прямо влияют на успешность и

эффективность последующих процедур трансформации, определяя результативность дальнейших биотехнических процессов (Qiu et al., 2020).

Точная количественная оценка выхода протопластов — важный этап процесса их выделения. Наиболее часто используемым методом для подсчёта протопластов является применение гемоцитометра, позволяющего достоверно определить их количество. Не менее значимым является и оценка жизнеспособности протопластов, которая отражает общее состояние здоровья выделенной популяции. Для этого применяют различные методы окрашивания, одним из наиболее распространённых является окрашивание флуоресцеином диацетатом (FDA). Это неактивное соединение способно проникать через клеточную мембрану живых клеток, где под действием ферментов превращается в желто-зелёные флуоресцентные продукты. Нежизнеспособные же протопласты не обладают необходимой ферментативной активностью, поэтому не флуоресцируют. Флуоресцентная микроскопия используется для подсчёта доли живых протопластов в общей популяции, что позволяет точно определить их жизнеспособность (Qiu et al., 2020).

Оценка выхода протопластов и их жизнеспособности является важнейшим этапом в процессе их выделения. Для количественного подсчёта протопластов широко применяются гемоцитометры, которые обеспечивают точное определение их количества. Для оценки жизнеспособности используют методы окрашивания, среди которых наиболее популярным является метод с флуоресцеином диацетатом (FDA). Эта методика позволяет с высокой точностью определить долю живых протопластов в общей популяции, что критически важно для успешного проведения трансформаций и получения достоверных результатов в биотехнологических и растеноводческих исследованиях (Chen et al., 2023).

1.12.8 Среда для культивирования протопластов

Необходимость разработки систем "протопласт-растение", особенно для экономически важных видов, требует значительных затрат ресурсов. Как правило, изолированные протопласты начинают регенерацию клеточной стенки

в течение короткого времени (часто минут) после введения в культуру. Однако они нуждаются в осмотической защите до тех пор, пока их новые первичные стенки не смогут противостоять тургорному давлению, оказываемому цитоплазмой. В некоторых случаях постепенное снижение осмотического давления путем разбавления культуральной среды раствором аналогичного состава, но с пониженным осмотическим давлением, необходимо для поддержания митотического деления, приводящего к образованию дочерних клеток и тканей (Davey et al., 2005).

Протопласты из разных видов и из разных тканей одного и того же вида могут отличаться по своим питательным требованиям. Оптимальные среды для культивирования протопластов сильно варьируют в зависимости от генотипа и используемой исходной ткани. Для культивирования протопластов часто используют обычные среды (MS (Murashige and Skoog, 1962), Gamborg (B5) (Gamborg et al., 1968), Kao and Michayluk (KM (Kao and Michayluk, 1975)), Y3 (Eeuwens, 1976) или Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969)) или их небольшие модификации (Reed and Bargmann, 2021).

Культуры протопластов также нуждаются в источнике углерода для энергетического метаболизма, обычно это сахароза или глюкоза и в меньшей степени маннит или сорбит. Хотя 2% сахарозы приводили к самой высокой скорости деления, последующего образования колоний не происходило. Только 1% сахарозы и 2% глюкозы приводили к образованию микрокаллусов, причем 1% сахароза быстрее приводила к образованию более крупных микрокаллусов.

Для роста состоящих из протопластов микрокаллусов необходимы регуляторы роста растений, в частности цитокинины и ауксины. Кроме того, в некоторых случаях полезной оказывается гибберелловая кислота (GA3). Наиболее распространенными цитокининами являются 6-бензиламинопурин (BAP), зеатин, кинетин, изопентенил аденин (2iP) и тидиазурон (TDZ). Наиболее распространенными ауксинами являются индол-3-уксусная кислота (IAA), индол-3-бутировая кислота (IBA), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4- D) и нафталинуксусная кислота (NAA). Оптимальные концентрации, комбинации и

соотношения сильно варьируют в зависимости от генотипа и исходной ткани протопластов (Reed and Bargmann, 2021).

1.12.9 Экспериментальные системы для культуры изолированных протопластов

Для культивирования протопластов было разработано несколько подходов, все они основаны на использовании жидких или полутвердых сред или их комбинации. Доступность стерильной пластиковой посуды облегчила выделение и культивирование протопластов. Дозирование суспензии протопластов в чашки Петри – самый простой вариант, поскольку среду можно легко заменить, чтобы постепенно снизить ее осмолярность, тем самым поддерживая рост протопластов. Капельки суспензии объемом около 100-150 μL полезны при ограниченном количестве протопластов, а метод массивов капель облегчает оценку комбинаций регуляторов роста.

Изолированные протопласты выдерживают жесткие условия, когда их помещают в полутвердую среду, причем в качестве желирующего агента впервые был использован агар. Протопласты остаются разделенными в полутвердой среде, а последняя поддерживает регенерацию стенок и способствует митотическому делению. Превосходство агарозы по сравнению с агаром в качестве желирующего агента может быть связано с ее нейтральностью. Полутвердая среда, содержащая суспендированные протопласты, может быть распределена в виде слоя или капель, причем объем последних в чашках Петри обычно составляет до 250 μL . Разделение слоя среды на сектора с последующим смачиванием секторов или капель в жидкой среде того же состава способствует росту протопластов. Поэтапное снижение осмотического давления легко достигается путем смены среды. Альгинат также используется для полутвердого состояния среды, причем желирование вызывается воздействием ионов кальция. Очень важно, что колонии, полученные из протопластов, могут быть высвобождены путем деполимеризации альгината при обработке цитратом натрия для удаления ионов кальция. Было обнаружено, что суспендирование протопластов в тонком слое жидкости над полутвердой средой стимулирует

образование колоний клеток, особенно если на границе жидкость/полутвердая среда находится фильтровальная бумага. Фильтровальная бумага может быть заменена бактериальным мембранным фильтром для получения аналогичного эффекта, как, например, в случае с рисом, или целлофановым слоем, как в случае с протопластами мха *P. patens*. В качестве опоры для протопластов в жидких и полутвердых культуральных системах также использовалась нейлоновая сетка. Удаление фильтровальной бумаги, бактериального фильтра, целлофана или нейлоновой фильтр облегчает перенос клеток, полученных из протопластов, в новую среду (Davey et al., 2005).

Представлен эффективный метод культивирования протопластов – метод "сверхтонкой альгинатной пленки". Разработка данного усовершенствованного метода культивирования протопластов стала результатом оценки эффективности и недостатков различных методов культуры протопластов. Эффективность этого метода оценивалась на двух модельных системах растений - *Nicotiana tabacum* и *Lotus corniculatus*. Проводилось также его сравнение с методом "тонкого альгинатного слоя" – другой эффективной системой культивирования протопластов. Результаты показали, что метод культивирования с использованием сверхтонкой альгинатной пленки так же эффективен, как и метод с тонким альгинатным слоем, и, помимо этого, имеет множество дополнительных преимуществ. Данная инновация преодолевает большинство ограничений описанных до сих пор методов культивирования протопластов и теперь может быть применена к широкому спектру культур для проверки возможностей ее широкого применения. Протокол ЕТАF, а также его сравнительная оценка с ТАЛ представлены ниже.

ТАЛ (тонкий альгинатный слой)

Квадраты полипропиленовой фильтра (10 на 10 ячеек, размер ячейки 2 на 2 мм) вырезали так, чтобы они точно помещались в чашки Петри диаметром 60 мм, и автоклавировали. Протопласты в растворе МММ550 с удвоенной плотностью суспендировали в равном объеме 2,8% (w/v) альгиновой кислоты (Sigma; приготовлена на основе солевого раствора МММ550), чтобы получить

конечную концентрацию альгината 1,4%. Для приготовления фильтр 625 мкл этой смеси помещали в центр слоя агара (20 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MES-буфер, отрегулированный до 550 мОсм (мосмоль) [примерно 0,5 М маннитол], 0,8% агара, pH 5,8) и накрывали полипропиленовой сеткой. Через 1 ч сетку осторожно сдвигали в одну сторону, вынимали тонким пинцетом и помещали в чашку Петри диаметром 60 мм, содержащую 10 мл среды для культивирования протопластов (PCM) (такая же, как среда для выделения протопластов, но отрегулированная до 550 мосмоль с 0,4 М глюкозой вместо 0,4 М сахарозы). Сетку дважды промывали PCM через каждые полчаса, чтобы удалить избыток CaCl₂, и затем культивировали в 2 мл культуральной среды в стерильной чашке Петри диаметром 60 мм в темноте или при рассеянном свете при температуре 25 ± 2 С.

ЕТАФ (сверхтонкий альгинатный слой)

Методика ЕТАФ включает следующие шаги. Каплю 50 мкл раствора CaCl₂ (20 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MES буфер, отрегулированный до 550 мосмоль [примерно 0,5 М маннитол], pH 5.8) помещали на автоклавируемое предметное стекло, протопласты удвоенной необходимой плотности смешивали с альгинатом в соотношении 1: 1 (50 мкл протопластов в MMM550 плюс 50 мкл альгината) и помещали над каплей CaCl₂ (это вызывает гелеобразование альгината). Сверху сразу же помещали чистое автоклавированное покрывное стекло. Далее с обеих сторон покрывного стекла добавляли по 50 мкл CaCl₂. Через 5 минут покрывное стекло постепенно сдвигали в одну сторону и в конце концов удаляли с помощью ювелирных щипцов. Покрывное стекло с очень тонким альгинатным слоем, содержащим внедренные протопласты, помещали в стерилизованную чашку Петри (чашка для культуры клеток, 35 на 10 мм, с размером ячеек 2 мм; Genetix, Бостон, Массачусетс, США), содержащую 2 мл ПКМ. Затем покрывное стекло дважды промывали, чтобы удалить избыток CaCl₂, и, наконец, культивировали в 500 мкл ПКМ и закрывали парафильмом. Инкубировали в темноте или на рассеянном свете при температуре 25 ± 2 С (Pati et al., 2005).

1.12.10 Условия культивирования протопластов

Условия культивирования протопластов, такие как использование жидкой или полутвердой среды, температура и освещенность или плотность клеток, могут оказывать значительное влияние на деление и потенциал формирования микрокаллуса протопластов.

1.12.10.1 Жидкая и полутвердая среда

При определении прочности среды для культивирования протопластов необходимо учитывать множество факторов, включая возможность визуализации, освежение среды, накопление токсинов и агрегацию клеток.

Жидкая среда – самая простая в изготовлении, поскольку не требует манипуляций с агаром. Однако она сталкивается с множеством проблем. При визуализации, если каждая клетка не находится в отдельном пространстве, невозможно проследить за ростом отдельной клетки. Кроме того, существует вероятность агрегации клеток с образованием неоднородного каллуса, что может привести к химеризму регенерированных растений. Агрегация также может привести к локальному накоплению токсичных веществ, выделяемых отмирающими клетками, которые могут подавлять рост соседних клеток (Deryckere et al., 2012).

Чтобы избежать агглютинации клеток, их физическое разделение можно обеспечить, поместив протопласты в полутвердую среду. Среда для встраивания обычно содержит агар, агарозу или альгинат в качестве затвердителя. Альгинат благоприятен для термочувствительных протопластов, поскольку желирование вызывается воздействием ионов кальция, а не необходимостью нагревать растворы агара или агарозы выше точки плавления (Reed and Bargmann, 2021).

При сравнении тонких альгинатных слоев и сверхтонких альгинатных пленок на культуре протопластов побегов моркови тонкие альгинатные слои привели к увеличению эффективности размножения почти на 20% в каждом тестируемом сорте (Maćkowska et al., 2014). Стерилизация альгинатного раствора через фильтр также дала более чем 10-процентное увеличение

эффективности размножения по сравнению с автоклавной стерилизацией у нескольких использованных сортов.

1.12.10.2 Температура и свет

Температурные и световые условия, используемые при культивировании протопластов, сильно различаются и, как было показано, влияют на успех регенерации. На культуры протопластов листьев капусты сильно влияли свет и температура: в культурах, перенесенных из темноты при 25°C на свет при 23°C после 7 дней культуры, происходило очень мало делений, по сравнению с культурами, находившимися в темноте все 15 дней (Kaur et al., 2006). Однако протопласты семядолей арабидопсиса не показали значительных различий ни в плотности посева, ни в скорости роста при культивировании на свету или в темноте (Dovzhenko et al., 2003).

1.12.10.3 Плотность клеток

Плотность посева протопластов может варьировать от единичных клеток до нескольких миллионов протопластов на миллилитр, но обычно составляет 5×10^4 – 1×10^6 протопластов/мл (Reed and Bargmann, 2021). При сравнении плотностей посева культуры протопластов листьев петунии (*Petunia hybrida*) 1×10^6 протопластов/мл обеспечили значительно более высокую частоту деления и количество каллусов, чем 5×10^4 протопластов/мл (Kang et al., 2020). Однако жизнеспособность микроколоний снижалась при увеличении плотности посева до $1,5 \times 10^6$ протопластов/мл, что, возможно, связано с высоким накоплением фенольных веществ. Избыток протопластов также может привести к снижению жизнеспособности из-за недостатка доступных питательных веществ (Kiełkowska and Adamus, 2021). Напротив, более низкая плотность может быть желательна для отслеживания отдельного протопласта после трансформации или слияния (Bhojwani and Dantu, 2013). Однако более низкая плотность протопластов может быть более дорогостоящей и трудоемкой. Кроме того, протопласты могут генерировать факторы роста, стимулирующие митотическое деление клетки неавтономно.

1.12.11 Регенерация растений из культуры протопластов

Из микрокаллусов регенерация может происходить путем органогенеза или эмбриогенеза. Микрокаллусы ориентированные на органогенез, можно перенести на среду для пролиферации каллуса, чтобы увеличить его размер, в то время как микрокаллусы, ориентированные на эмбриогенез, можно перенести на среду для формирования эмбрионов; однако в зависимости от генотипа, исходной ткани и состава среды на среде для микрокаллусов можно также пролиферировать каллус или сформировать эмбрионы.

Органогенез обычно основывается на переносе каллуса на среду, содержащую цитокинин и ауксин, или на среду для прорастивания, а затем на среду для укоренения. Когда речь заходит о сроках регенерации, трудно напрямую сравнивать органогенез и эмбриогенез у разных видов и исходных тканей. Теоретически эмбриогенез должен занимать меньше времени, чем органогенез, из-за длительного времени, необходимого каллусу для прорастания и последующего укоренения, в отличие от способности эмбриона расти и развивать оба органа одновременно (Reed and Bargmann 2021).

Когда речь идет о регенерации растений из протопластов, полученных из каллусов, эмбриогенных или соматических, состав среды может определять эффективность регенерации. В большинстве методов используется твердая среда MS, дополненная ауксином и цитокинином. Как правило, основной целью является получение черенков, после чего происходит укоренение, а затем высадка в почву. Как правило, легче получить корни из побегов, чем побеги из корней (Reed and Bargmann 2021).

1.12.12 Сомаклональная изменчивость

Сомаклональная изменчивость – это генетическая или фенотипическая вариация, возникающая у растений, полученных в культуре тканей. Фенотипическое изменение может быть объяснено либо генетической, либо эпигенетической модификацией. Сомаклональная изменчивость может влиять на фертильность регенеранта, а также на возможность изменения уровня

плоидности, что имеет решающее значение для селекции (Reed and Bargmann, 2021).

Соматическая изменчивость – это потенциальное явление при регенерации протопластов, которое может проявляться в морфологических или плоидных вариациях. При рассмотрении роли метода культивирования в контексте соматической изменчивости одна из гипотез заключается в том, что если дупликация генома произошла во время культивирования протопластов, то, скорее всего, это связано с тем, что тетраплоидные протопласты делятся быстрее диплоидных. Если полиплоидизация произошла во время формирования каллуса, то гипотезой является эндоредупликация (амплификация ДНК без митоза) в клетках каллуса, показанная ранее.

Время, проведенное в культуре тканей, увеличивает вероятность соматической изменчивости, в связи с чем выделение протопластов из растительной ткани может быть более предпочтительным, чем выделение из каллусной ткани, во избежание соматической изменчивости из-за дополнительного этапа *in vitro*, который требуется для получения каллуса. Этот дополнительный этап может внести генетическую изменчивость и повлиять на эффективность регенерации протопластов. Хотя соматическая изменчивость нежелательна в коммерческом растениеводстве, ее преимущество заключается в создании фенотипической вариативности при большом количестве регенерантов, которые можно получить с помощью регенерации протопластов (Reed and Bargmann, 2021).

1.13 Соматическая гибридизация / слияние протопластов

Соматическая гибридизация – это механизм, с помощью которого протопласты соматических клеток выделяются, сливаются и регенерируют в гибридные растения. Слияние протопластов – это спонтанное или индуцированное смешение протопластов двух разных геномов.

1.13.1 Спонтанное слияние

Основной причиной спонтанного слияния является физический контакт. Благодаря обработке ферментами во время выделения протопласты спонтанно сливаются. В результате слияния протопластов из соседних клеток образуются многоядерные протопласты, что является широко распространенным явлением у различных видов, в частности у табака и цитрусовых (Guo et al., 2013). Однако выход спонтанно слившихся протопластов низок и неопределенен, поэтому было бы предпочтительнее разработать более адекватную методику для индуцирования слияния с большей частотой.

1.13.2 Индуцированное слияние

Может быть индуцировано химически (хемослияние) или электрически (электрофузия).

Химическое слияние

Полиэтиленгликоль (ПЭГ), NaNO_3 и ионы кальция (Ca^{++}) являются одними из химических веществ, используемых для принудительного слияния протопластов. Асимметричное хемопротопластное слияние было использовано для получения цибридов сельдерея (Bruznican et al., 2021). Соматическая гибридизация была проведена в рамках исследовательского проекта у *Phaseolus* с использованием технологии химического слияния протопластов (Geerts et al., 2008).

Электрофузия

При электрофузии протопластов сначала используется переменный ток, чтобы стимулировать перенос протопластов и установить тесный контакт с мембраной. Затем применяются непрерывные импульсы, чтобы вызвать разрушение мембраны в местах контакта. Популярность электрофузии возросла, поскольку она менее вредна для протопластов, чем химические методы, несмотря на необходимость использования дорогостоящего и специализированного оборудования для создания полей переменного тока и импульсов постоянного тока. Электрофузия протопластов облученного

ультрафиолетом мандарина Сатсума с Цзиньчэном (*C. sinensis Osbeck*), высококачественным местным сортом, привела к регенерации нескольких побегов (Xu et al., 2007). Сообщается, что с помощью электрофузии с использованием двойной маркировки протопластов и раннего отбора слившихся клеток с помощью микроманипулятора, были успешно получены и отобраны межвидовые соматические гибриды культурной и дикой моркови. Оба подвида, использованные в этом исследовании, были идентифицированы по исключительно высокой способности к регенерации в культурах протопластов (Mackowska et al., 2023).

1.14 Вклад соматической гибридизации в улучшение сельскохозяйственных культур

Половые репродуктивные барьеры, такие как несовместимость, препятствуют передаче некоторых элитных селекционных признаков, таких как ЦМС, качественные признаки и устойчивость к болезням, с помощью традиционных методов селекции, использующих половую гибридизацию.

Однако эти барьеры можно преодолеть с помощью слияния протопластов. Использование генетического разнообразия культурных растений и их диких сородичей может привести к созданию культур с улучшенными признаками и оказать значительное влияние на устойчивую продовольственную безопасность (Aljaramany et al., 2024). Соматическая гибридизация представляет собой мощный инструмент для переноса геномов или геномных фрагментов диких растений с полезными агрономическими характеристиками в коммерческие культуры. Слияние протопластов позволяет избежать недостатков пре- и постзиготных барьеров половой гибридизации и объединять сексуально несовместимые зародыши между культурами и даже между филогенетически далекими растениями. Этот процесс также позволяет передавать желаемые признаки, закодированные пластидными или митохондриальными геномами некультивируемого сорта, коммерческой культуре (Garcia et al., 2019).

1.14.1 Solanaceae (табак, картофель, томат, баклажан)

В исследовании Patel et al., соматическая гибридизация была использована для создания новой гибридной комбинации двух несовместимых при половой гибридизации тетраплоидных видов табака, *Nicotiana x sanderae* и *N. debneyi*. Все соматические гибридные растения были фертильными. В отличие от родительских растений *N. × sanderae*, семенное потомство соматических гибридных растений было устойчиво к заражению *Peronospora tabacina*. Это свойство было привнесено от дикого родителя, *N. debneyi* (Patel et al., 2011). Были выведены соматические гибриды с качественными свойствами, например, с высоким содержанием никотина (Bhattacharjee et al. 2015).

В связи с тем, что культурный картофель не обладает устойчивостью к бактериальному увяданию, вызываемому *Ralstonia solanacearum*, методом электрофузии протопластов мезофилла были получены соматические гибриды между дигаплоидным клоном картофеля *Solanum tuberosum* cv. BF15 и *S. stenotomum*. По данным Fock et al., всего было получено тридцать гибридных растений, которые отличались сильной жизнеспособностью и промежуточными морфологическими характеристиками, включая морфологию листьев, цветков и клубней. Исследование методом проточной цитометрии показало, что 25 растений были тетраплоидами (4×; 48 хромосом), три - гексаплоидами (6; 72) и два - анеуплоидами (<4×; 48). Изучение изоферментных паттернов для эстеразы и ДНК-маркеров простых последовательностей (SSR) подтвердило их гибридную природу, а анализ микросателлитов хлоропластной (ct) ДНК у четырнадцати соматических гибридов показал, что шесть гибридов имели ctDNA *S. stenotomum* и восемь - ctDNA *S. tuberosum*. Интересно, что все исследованные соматические гибриды продемонстрировали уровень устойчивости, сравнимый с дикими видами (Fock et al., 2001).

Yu et al., продемонстрировали успешное внедрение устойчивости к бактериальному увяданию от *S. melongena* (2n=2x=24) в дигаплоидный *S. tuberosum* (2n=2x=24). Было получено 34 соматических гибрида. Анализ цитоплазматического генома показал, что митохондриальная ДНК обоих

родителей сосуществовала и/или рекомбинировала в большинстве гибридов. Однако в гибридах сохранилась только хпДНК картофеля, что означает совместимость между хпДНК и ядерным геномом клетки. Анализ устойчивости при инокуляции патогеном показал, что устойчивость к бактериальному увяданию была успешно перенесена из баклажана в гибриды, что обеспечивает потенциальную устойчивость к бактериальному увяданию для селекции картофеля (Yu et al., 2013).

В этой области были успешно получены гаплоидные растения из слияния протопластов *S. bulbocastanum* и *S. tuberosum*. Данные гибриды обладают элитными признаками обоих родителей. Из 42 регенерантов, проанализированных с использованием ISSR маркеров, были идентифицированы 11 соматических гибридов, причем у некоторых гибридов наблюдалась потеря или усиление фрагментов по сравнению с родителями, скорее всего, из-за перестроек и делеций хромосомных сегментов после слияния и/или соматических изменений во время регенерации гибридов (Iovene et al., 2012).

1.14.2 Brassicaceae (капуста, редис, рапс)

Капустные овощные культуры, особенно культурные сорта *Brassica oleracea* L., подвержены различным заболеваниям, что приводит к значительным потерям в производстве и снижению рыночной стоимости. Введение генов, устойчивости к болезням, является одной из основных целей селекции растений. Для передачи устойчивости к *Alternaria brassicicola*, *A. brassicae*, *Phoma lingam*, *Plasmodiophora brassicae* и вирусу мозаики турнепса (TuMV) в *Brassica oleracea* var. *capitata* (cv. 'Toskama') и *botrytis* (cv. 'Korso') были созданы соматические гибриды с использованием ПЭГ-индуцированных симметричных и асимметричных слияний протопластов. В качестве доноров устойчивости были выбраны десять растений из разных родов семейства Brassicaceae, включая диких родственников. Из 2189 растений (соматических гибридов, частично клонированных *in vitro*) 1616 (73,8 %) были устойчивы хотя бы к одному из

заболеваний, что свидетельствует об успешной передаче устойчивости (Scholze et al., 2010).

Hansen and Earle (1995) исследовали возможность передачи гена устойчивости Rb от *Brassica carinata* к *B. oleracea* var. *italia* с помощью соматической гибридизации (Zubko et al., 2018).

Соматическая гибридизация использовалась для введения признака ЦМС в селекционные программы, но из-за большой полезности фенотипа ЦМС в селекции растений его часто вводят в интересующую культуру из природных популяций или создают *in vitro* с помощью генной инженерии, внутривидового, межвидового или межродового скрещивания или слияния протопластов (Wu et al., 2019).

Слияние протопластов может быть использовано для создания новых ядерно-цитоплазматических комбинаций, что приводит к расширению цитоплазматического разнообразия. У *Brassica napus* были описаны различные цитоплазматические структуры мужской стерильности, включая цитоплазматическую мужскую стерильность у Ogura, Tour и Polima, а также цитоплазматическую мужскую стерильность у редиса Kosena. Соматическая гибридизация была использована для включения их в новые генотипы. Молекулярные маркеры были использованы для идентификации гибридных или гибридных продуктов слияния, которые прорастали в средах, содержащих антибиотики или гербициды (Christey, 2004).

1.14.3 Apiaceae (морковь, кориандр, сельдерей, петрушка, фенхель)

До сих пор сообщалось о выделении протопластов из *Daucus carota* (морковь), *Coriandrum sativum* (кориандр), *Apium graveolens* (сельдерей), *Petroselinum Hortense* (петрушка) и *Foeniculum vulgare* (фенхель) из семейства Apiaceae (Bruznican et al., 2021).

Tan et al., асимметрично соединили протопласты моркови, обработанной УФ-светом, и сельдерея, обработанного IOA iodoacetamide, чтобы получить 11 петалоидных ЦМС-растений сельдерея Tan et al., (2009). Самое последнее восстановление ЦМС-гибридов произошло при слиянии инактивированных

акцепторных протопластов сельдерея и УФ-инактивированных донорных протопластов моркови. Однако в этом исследовании восстановление ЦМС-гибридов при использовании донорских протопластов кориандра или сельдерея осуществить не удалось (Bruznican et al., 2021).

1.14.4 Семейство травянистых Poaceae или Gramineae (кукуруза, пшеница, рис, ячмень, овес)

Имеются многочисленные сообщения о соматических гибридах. Опосредованная слиянием протопластов соматическая гибридизация может быть полезным инструментом для генетического улучшения злаков. После соматической гибридизации пырея высокого *Agropyron elongatum* с протопластами пшеницы *Triticum aestivum* cv. Jinan177. две линии (CU и XI) были самооплодотворяющимися, все потомки CU были фенотипически сравнимы с родителями пырея высокого, а потомки XI имели более тонкие, гладкие и мягкие листья (Cui et al., 2009). В этой связи у хлебной пшеницы *Triticum aestivum* был успешно применен подход соматического слияния с использованием протопластов из нетипотентной клеточной линии, пригодной для культуры *in vitro* T1, в комбинации с тотипотентными протопластами, выделенными из эмбриогенных каллусов T2 и овса *Avena sativa* (Xiang et al., 2010).

Асимметричная соматическая гибридизация была использована для переноса признака устойчивости к бактериальному увяданию из *Oryza meyeriana*, дикого вида риса, в элитный японский сорт риса (Dalixiang). Анализ случайной амплифицированной полиморфной ДНК показал, что гибридные растения имеют паттерны полос, полученные ими от родительских генотипов. Устойчивость к патогенам бактериального увядания была средней у большинства гибридов по сравнению с *O. meyeriana* и *O. sativa* cv. Dalixiang. Четыре гибридные линии имели высокую устойчивость к бактериальному увяданию, но она была ниже, чем у *O. meyeriana* (Yan et al., 2004).

1.14.5 Рутовые (Rutaceae) (виды цитрусовых)

Соматическая гибридизация решила множество проблем, связанных с репродуктивными характеристиками цитрусовых, позволив вывести новые генотипы. Из-за апомиксиса и длительного ювенильного периода обычная гибридизация, кажется, для цитрусовых непрактичной. В результате соматической гибридизации корневища цитрусовых стали более устойчивыми к многочисленным биотическим и абиотическим вызовам, что также улучшило качество и продуктивность плодов. Было проведено слияние протопластов между привойными сортами сладкого апельсина и гибридов мандарин/мандарин, регенерированные растения были охарактеризованы по толщине листьев, уровню плоидности и молекулярным маркерам SSR. Растения были успешно созданы только в том случае, если эмбриогенным родителем был сладкий апельсин 'Pera'. Было получено 15 растений, 7 из которых были тетраплоидными и 8 диплоидными. На основании анализа молекулярных маркеров SSR все 7 тетраплоидных растений оказались аллотетраплоидами (соматическими гибридами). Этот гибридный материал может быть использован в качестве тетраплоидного родителя в отдаленных скрещиваниях для селекции цитрусовых (Soriano et al., 2012)

Guo et al., провели эксперименты по соматическому слиянию цитрусовых, направленные на создание бессемянных цибридов путем целенаправленной передачи ЦМС с помощью слияния эмбриогенных протопластов каллуса одного родителя с протопластами листьев второго родителя. В ходе экспериментов по симметричной соматической гибридизации селекционные программы для рода *Citrus* использовали благоприятные признаки двух сортов. *C. inshui* cv. *Satsuma*, который демонстрирует ЦМС и не производит семян, был скрещен с сортом *C. grandis* НВР, известным своим высоким коммерческим качеством и большим количеством семян (Guo et al., 2004).

Другой пример использования соматической гибридизации – передача желательных митохондриально-кодируемых признаков, включая устойчивость к цитрусовому раку, вызываемому *Xanthomonas citri* (Murata et al. 2019).

Межродовая соматическая гибридизация между апельсином *Valencia C. sinensis* и кумкватом *Meiwa Fortunella crassifolia* привела к увеличению энергичности потомства. Когда данные о рисунке полос мтДНК были сопоставлены с наблюдениями за фенотипическими характеристиками в поле, было обнаружено, что более сложный рисунок полос мтДНК соответствует повышенной энергичности растений (Cheng et al., 2003).

1.14.6 Соматическая гибридизация в других важных сельскохозяйственных культурах

В дополнение к вышеупомянутым применениям было предложено распространить технологию соматической гибридизации на многие другие садовые культуры, в частности, на ягодные культуры. Так, были успешно слиты протопласты (ПЭГ-индуцированные) *Rubus fruticosus* (ежевика; $2n=4x=28$) с *R. ideaus* (малина, $2n=2x=14$). Для получения нескольких каллусных линий было начато формирование колоний на твердой среде. Был проведен цитологический анализ отобранных каллусных линий с гексаплоидным хромосомным числом. Молекулярно-цитогенетическими методами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием рибосомной ДНК (рДНК) были изучены две гексаплоидные каллусные линии слияния, выделенные по однородности роста и уровню плоидности. Анализ выявил переменное количество и размеры локусов, и геномная гибридизация *in situ* (GISH) показала наличие гетерокариона в слившихся каллусных линиях. Результаты FISH свидетельствуют о том, что произошли большие перестройки кариотипа, включая изменение числа хромосом и транслокации локусов рДНК (Mezzetti et al., 2001).

Соматическая гибридизация позволяет заменить цитоплазму культурного сорта за один шаг, что чрезвычайно эффективно, учитывая традиционный метод, требующий нескольких беккроссов для введения экзогенной цитоплазмы в культуры. Наконец, соматическая гибридизация используется в фундаментальной науке для изучения ядерно-цитоплазматического состава и закономерностей метилирования ДНК, а также для исследования путей

рекомбинации, происходящей между мтДНК донора и реципиента (Garcia et al., 2019).

1.14.7 Ограничения метода соматической гибридизации

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные во всем мире с использованием технологии соматической гибридизации для получения улучшенных растений, существуют проблемы и ограничения для широкомасштабного применения. Наиболее существенным из таких ограничений является то, что соматическая гибридизация не гарантирует, что растения будут производить жизнеспособные и фертильные семена, и не дает гарантии успешной экспрессии определенного признака.

Поскольку соматические гибриды имеют геномы обоих родителей, они могут проявлять как желательные, так и нежелательные черты своих слившихся родителей, что приводит к непредсказуемым фенотипическим характеристикам и, возможно, делает их непригодными для использования (Vales et al., 2007). Кроме того, в результате введения значительного количества экзогенного генетического материала в дополнение к интересующим генам может возникнуть генетический дисбаланс. Плоды могут иметь нежелательные характеристики, такие как толстая, неровная кожица, что ограничит их использование (Liu et al., 2002).

Стоит отметить, что культура протопластов ассоциируется с генетической нестабильностью, а сам протокол часто требует много времени и сил, а низкая эффективность регенерации проростков *in vitro* является ограничением для многих видов.

1.14.8 Выведение гибридов: стратегии получения линий ЦМС путем слияния протопластов

Применение соматической гибридизации для передачи или создания *de novo* признака цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) обладает рядом преимуществ по сравнению с половым размножением. При классическом половом скрещивании вместе с генами, отвечающими за ЦМС, могут

передаваться и другие гены, что иногда вызывает нежелательные эффекты (Yamagishi and Bhat, 2014). Методы цибридизации на основе слияния протопластов стали ценным инструментом для внедрения или создания состояний ЦМС с использованием различных подходов. В одной из таких стратегий митохондриальный геном цибрида является рекомбинантным, содержащим участки мтДНК обоих родителей, а ядерный геном при этом принадлежит одному из них (Shankar et al., 2013). В некоторых случаях донор в цибридизации мужским линиям фертилен, но в его ядре присутствуют митохондриальные ORF, отвечающие за ЦМС, а также аллели, восстанавливающие фертильность. В цибриде ORF, связанный с ЦМС, оказывается в ядерном фоне без восстанавливающих аллелей, что приводит к проявлению ЦМС-фенотипа (Hanson and Bentolila, 2004). Например, межродовой соматический гибрид между *M. arvensis* и *B. juncea* проявляет мужскую стерильность благодаря митохондриальному orf108, унаследованному от *M. arvensis*, который сам по себе фертилен за счёт ядерного рестайлера фертильности (Wu et al., 2019).

В качестве альтернативного пути создание признака цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) может происходить *de novo* за счёт образования химерных открытых рамок считывания (ORF) вследствие межгеномной рекомбинации митохондриальной ДНК у соматических гибридов (Wu et al., 2019). Например, слияние протопластов *Brassica napus* и *Isatis indigota* привело к появлению растения с пониженной жизнеспособностью пыльцы. Анализ митохондриальных геномов родителей и гибридов выявил, что рекомбинантный ген *cox2* является кандидатом на роль гена, вызывающего ЦМС (Kang et al., 2017).

Признак ЦМС был включён в селекционные программы как напрямую, так и опосредованно с помощью соматической гибридизации (Yamagishi and Bhat, 2014). Так, фенотип ЦМС дикого растения *Raphanus sativus* cv. *Kosena* был перенесён в *Brassica napus* через асимметричное слияние протопластов. Секвенирование митохондриального генома соматического гибрида SW18 и его

сравнение с родительскими мтДНК показали, что митохондриальный кодон ORF125, полученный от *Raphanus sativus* cv. *Kosena*, ответственен за ЦМС.

В ряде случаев ЦМС может передаваться косвенно (Garcia et al., 2019). Сначала условие ЦМС переносят на культуру через межродовую половую гибридизацию с дальнейшими беккроссами, а затем включают в селекционные схемы с помощью протопластного слияния (Garcia et al., 2019). Например, ЦМС была перенесена из *Raphanus sativus* cv. *Ogura* в *Brassica napus* половым межродовым скрещиванием. Полученный сорт проявил ЦМС, но столкнулся с проблемой хлороза из-за несовместимости ядерного и хлоропластного геномов. Для решения этой проблемы хлоропласт *Raphanus sativus* был заменён на хлоропласт *Brassica napus* путём внутривидовой соматической гибридизации между ЦМС-линей и фертильной линией *B. napus* (Garcia et al., 2019).

В рамках экспериментов по симметричной соматической гибридизации в селекционных программах рода *Citrus* использовались ценные качества двух различных сортов. Так, культурный сорт *Citrus inshui* cv. *Satsuma*, характеризующийся цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) и отсутствием семян, был объединён с сортом *Citrus grandis* НВР, обладающим высокими коммерческими качествами, но дающим большое количество семян (Guo et al., 2004). Хотя до конца не выяснено, является ли ЦМС в *C. inshui* cv. *Satsuma* строго цитоплазматическим признаком, его митохондриальная ДНК, введённая на фоне ядерного генома *C. grandis*, вызвала проявление ЦМС (Guo et al., 2004).

1.15 Гибридизация / Цитоплазматический гибрид как инструмент для создания ЦМС в растениях

При половом скрещивании пластидные и митохондриальные геномы передаются преимущественно по материнской линии. В процессе слияния клеток у гибридов объединяются ядра и цитоплазмы обоих родителей, что приводит к формированию различных нуклео-цитоплазматических комбинаций. Взаимодействие между геномами ядра и органелл может способствовать

успешному возникновению гибридов. Слияние протопластов, приводящее к появлению таких гибридных клеток, называется цибридизацией. Этот метод позволяет получать гетерозиготность внехромосомного генетического материала, что имеет важное значение для улучшения селекционных программ растений (Bora, 2023).

Поскольку фенотип цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) обладает высокой селекционной ценностью, его часто переносят в целевые культуры из природных источников либо создают заново в лабораторных условиях. ЦМС можно искусственно индуцировать посредством внутривидового, межвидового или межродового скрещивания, слияния протопластов или методов генной инженерии (Wu et al., 2019). Метод соматической гибридизации, основанный на слиянии протопластов, объединяет соматические клетки двух различных сортов, видов или родов растений с целью формирования нового генетического материала (Cheng et al., 2003). Этот процесс состоит из четырёх основных этапов: первый — изоляция протопластов от двух родительских форм путём деградации клеточной стенки; второй — вызов слияния протопластов с помощью электрического или химического воздействия; третий — регенерация полученных гибридных каллусов и растений; четвёртый — селекция соматических гибридных линий, обладающих желательными признаками (Liu et al., 2005).

Слияние протопластов может происходить как симметрично, так и асимметрично в зависимости от того, какова степень участия генов ядра и цитоплазмы каждого из родителей. При симметричном слиянии вклад геномов обоих родителей равнозначен, то есть оба ядра объединяются и формируют ядерный геном соматического гибрида. Для ограничения генетического вклада одного из родителей ядро его клетки может быть разрушено с помощью радиации, что приводит к асимметричному слиянию протопластов. В этом случае гибрид содержит полный геном "реципиента" и лишь фрагменты генома донора (Cheng et al., 2003). Цибрид, или цитоплазматический гибрид, представляет собой особый тип асимметричного гибрида, в котором ядерный

геном поступает от одного родителя, а цитоплазматические геномы — от обоих, при этом приобретая новые свойства. Согласно Arimura et al., (2018), по мере деления клеток хлоропласты чаще всего сохраняются материнские, а митохондриальные геномы становятся рекомбинантными, включающими сегменты обеих родительских мтДНК. Благодаря тому, что ядерный геном цибридов целиком принадлежит одному из родителей, они представляют особый интерес для селекционных программ (Cheng et al., 2003). Кроме того, цибриды нередко проявляют фенотип ЦМС, что делает их ценным инструментом в селекции растений (García et al., 2019).

1.16 Аллоплазматические линии

Аллоплазматические линии возникают, когда цитоплазма одного вида заменяется цитоплазмой другого вида в результате замещающего беккроссинга. Такое аллоплазменное состояние нарушает взаимодействие между ядром и цитоплазмой, которые коэволюционировали вместе. Нарушение ядерно-митохондриальных (ЯМ) взаимодействий у растений в результате аллоплазматического состояния обычно приводит к цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Считается, что пыльцеобразующие ткани требуют огромного количества энергии и имеют более низкий порог к дефициту дыхания, чем другие ткани растений. Поэтому в большинстве случаев аллоплазматические линии также являются ЦМС. Во всех рассмотренных случаях фенотип ЦМС обусловлен наличием новых белков в митохондриях, влияющих на функцию митохондрий и развитие пыльцы (Noyszewski et al., 2014).

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2021-2025 годах на кафедре молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева.

2.1 Скрининг на цитоплазматическую мужскую стерильность у близкородственных видов моркови

Цель данного этапа заключалась в том, чтобы найти родственный вид моркови, который обладает признаком ЦМС. Для этого были изучены имеющиеся генетические коллекции сельдерея (Мамбо, Сиенна, Танго, Балена) и фенхеля (Драгон).

Эксперимент был поставлен в Селекционно-семеноводческом центре овощных культур на базе РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, идентификация ЦМС проводилась на двух уровнях фенотипическом и молекулярно-генетическом.

Для исследования использовали шесть различных сортов. Семена были высеяны, проростки были получены в теплице в феврале 2022 года (рис. 6).



Рисунок – 6 Проростки всех образцов, высеянных в теплице в 2022 году

2.1.1 Фенотипические исследования флоральных структур в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея

Для определения цветочных признаков сельдерея и фенхеля были высажены по схеме 60 × 45 см в предварительно подготовленную теплицу. Признаки цветка, такие как цвет лепестка, цвет лепестков, выступ завязи, форма лепестков и пыльника, наблюдались визуально. Для обнаружения пыльцевых зерен цветы с каждого растения были собраны и изучены с помощью микроскопа и зафиксированы цифровой камерой (BUC5F-830CC, Sony Exmor CMOS Sensor, ULTRA-FINE COLOR ENGINE INSIDE).

2.1.2 Молекулярные исследования типов ЦМС в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея

2.1.2.1 Выделение ДНК

Были собраны здоровые и незараженные листья 6-недельных растений (рис. 7 а) каждого образца, из молодых тканей листьев в соответствии с процедурой СТАВ (Murray and Thompson, 1980) с некоторыми изменениями была выделена геномная ДНК.

Приблизительно 100 мг растительных тканей помещали в пробирку объемом 1,5 мл и приступали к выделению ДНК. В каждую пробирку добавляли по 500 мкл буфера для выделения ДНК (Ex. буфер, Nuclei буфер, Sarcosil 5% и бисульфит натрия NaHSO_3). Ткани гомогенизировали пестиком и инкубировали в термостате при 65°C в течение 60 мин, перемешивая каждые 15 мин. Затем к смеси добавляли 500 мкл хлороформа и изоамилового спирта $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ (24:1) (рис. 7 б), перемешивали в течение 7 мин, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость из каждой пробирки переносили в чистую с 500 мкл холодного изопропанола и оставляли на 10 мин (рис. 7 с). Смесь снова центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин, жидкость сливали, добавляли 500 мкл 80% этанола и центрифугировали 5 мин. Далее этанол сливали, осадок сушили с помощью вакуумной установки. Затем добавляли 50 мкл бидистиллированной воды и хранили при +4°C в течение 24 часов.

Качество и количество ДНК оценивали с помощью кюветного спектрофотометра IMPLEN NanoPhotometer. В предварительном исследовании для стандартизации условий амплификации для каждой пары праймеров отдельно была взята ДНК из 11 растений. При этом отобранные образцы всех исследуемых растений (селекционные линии моркови Т MS, Тайфун MS, СКС MS, Вилморин MS, Вилморин Ф и сельдерея: Сиенна, Балена, Танго, Диамант и Мамбо, фенхел Драгон) были использованы для сравнительного исследования между различными мужскими стерильными и фертильными растениями.

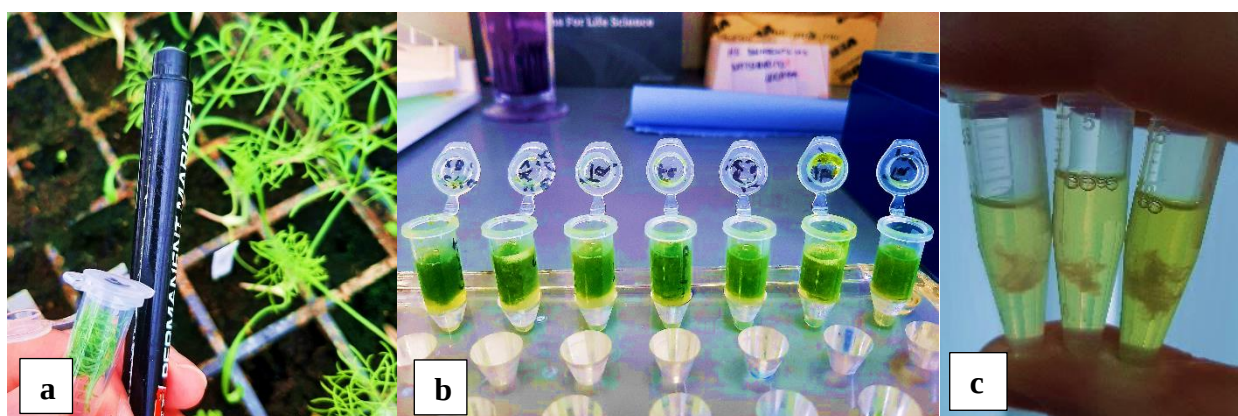


Рисунок – 7 а) Сбор молодых листьев с 6-недельных растений; б) Размягчение тканей с буфером для экстракции; с) Осажденная ДНК

2.1.2.2 Комбинации праймеров и ПЦР-анализ

Опираясь на исследование Чистовой А.В. с соавторами (2018), мы составили три комбинации праймеров с использованием праймеров представленных ниже:

- ✓ Cmt-1 (GCAAGAAGGAAAGCTGTTAGAG)
- ✓ Cmt-2 (GGTATCCCTCTTCTGTTTCGG)
- ✓ Atp1-d1 (CGCGTTGGGAGTACCTATTGA)
- ✓ Cmt-3 (GAGGAATACGTGAGACAACA)
- ✓ Cmt-4 (TCCCGCAGGTCGTCAACAG)

Были использованы лучшие пары праймеров для выявления петалоидных ЦМС (Чистова, 2018):

- (cmt-1 с cmt-2) показывают, что в образцах с петалоидной цитоплазмой полоса на уровне 320 п.н., в образцах с нормальной цитоплазмой полоса на уровне 390 п.н.

- (atp1-d1 с cmt-3) показывают полосу в образцах с петалоидной цитоплазмой 1630 п.н.

- (atp1-d1 с cmt-4) показывают полосу в образцах с нормальной цитоплазмой 1608 п.н.

Анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в 15 мкл реакционных объемов с 50 нг геномной ДНК, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (Evrogen, ОАО, Россия), 1,0 мкМ каждого праймера, 0,5 мкл mM смеси dNTP (Evrogen, ОАО, Россия) и 1 мкл 10× ПЦР-буфера. Условия амплификации для целевых геномных областей были следующими: один цикл при 94 °С в течение 2 мин; 35 циклов, каждый из которых включал: 94 °С в течение 1 мин, 55 °С, понижающиеся на 1 °С за цикл в течение 1 мин, и 72 °С в течение 2 мин 30 с; и заключительный цикл 72 °С в течение 7 мин (Чистова, 2018).

Амплифицированные продукты окрашивали флюоресцентным красителем GelRed и разгоняли в 1,0% агарозных гелях с ТВА при постоянном напряжении 100 В в течение 45 мин с помощью системы горизонтального гель-электрофореза (BioRad, США), визуализировали и фотографировали с помощью BioRad Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ с программным обеспечением Image Lab™.

2.2 Анализ митохондриальной ДНК ЦМС у моркови:

Выделение ДНК из листьев моркови проводили по стандартному протоколу с использованием СТАВ. ПЦР-амплификация митохондриальных генов проводилась с использованием специфических праймеров, разработанных для известных ЦМС-ассоциированных регионов. Затем амплифицированные продукты (ПЦР-продукты) анализировали с помощью гель-электрофореза и секвенирования для выявления потенциальных маркеров, связанных с цитоплазматической мужской стерильностью моркови.

Для секвенирования продуктов ПЦР были предприняты следующие шаги. Участки геля с целевым ДНК-фрагментом вырезали и помещали в пробирку типа Эппендорф, добавляли 2,5 объема 7М NaI или 6М KI, чтобы покрыть весь гель в пробирке, пробирку помещали в термостат или водяную баню при 65°C на 5 минут до полного растворения геля при нагревании, к смеси добавляли 5-10 мкл стекломолока и взбалтывали с помощью вортекса для обеспечения полной однородности. Пробирку держали на льду 5 минут, затем центрифугировали 10 секунд при максимальных оборотах, сливали плавающую жидкость и трижды промывали осадок 100 мкл нового промывочного раствора (100 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7,2), 1 mM ЭДТА, 50% C₂H₅OH), при каждом промывании: добавляли новый промывочный раствор, перемешивали на вортексе, центрифугировали 15 секунд (максимальные обороты), жидкость сливали. На последней промывке тщательно удаляли весь новый промывочный раствор пипеткой, не касаясь осадка. Добавляли 10-20 мкл воды MilliQ (дважды дистиллированной) (MQ), осадок растворяли в воде с помощью вортекса. Пробирку снова помещали в термостат при 65°C на 2 минуты, центрифугировали 15 секунд при максимальных оборотах в минуту, пипетировали жидкость, не касаясь осадка, и переносили в новую пробирку. Данный шаг повторяли, используя воду MQ, чтобы получить очищенную ДНК. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра и отправляли на секвенирование в компанию Evrogen.

2.3 Половая гибридизация

Для межвидовых скрещиваний в качестве женских родителей использовали мужски стерильные и фертильные культурные растения *Apium graveolens*, а в качестве мужских - фертильные растения *D. carota*. Апиумы имеют идеальные цветки, но не могут самоопыляться, поскольку мужские пыльники сбрасывают пыльцу до того, как женское рыльце становится восприимчивым. Поэтому мы были уверены, что все полученные зародыши не развились после случайного самоопыления.

Цветущие растения выращивали в теплице селекционно-семеноводческого центра РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Они цвели в мае каждого года. Эксперименты по скрещиванию проводились каждую весну (май-июнь) в период 2023-2024 гг.

Для опыления отбирали закрытые цветковые бутоны (до начала цветения) и открытые цветки мужски стерильного сельдерея. Пестики с восприимчивыми рыльцами опылялись в естественных условиях. Ручное опыление проводили с 08:00 до 10:00 час. утра с помощью чистых пылевых зерен, собранных с раскрывшихся цветков моркови (рис. 8). Каждое опыленное соцветие сельдерея или фенхеля был помечен датой на этикетке и комбинацией скрещивания.

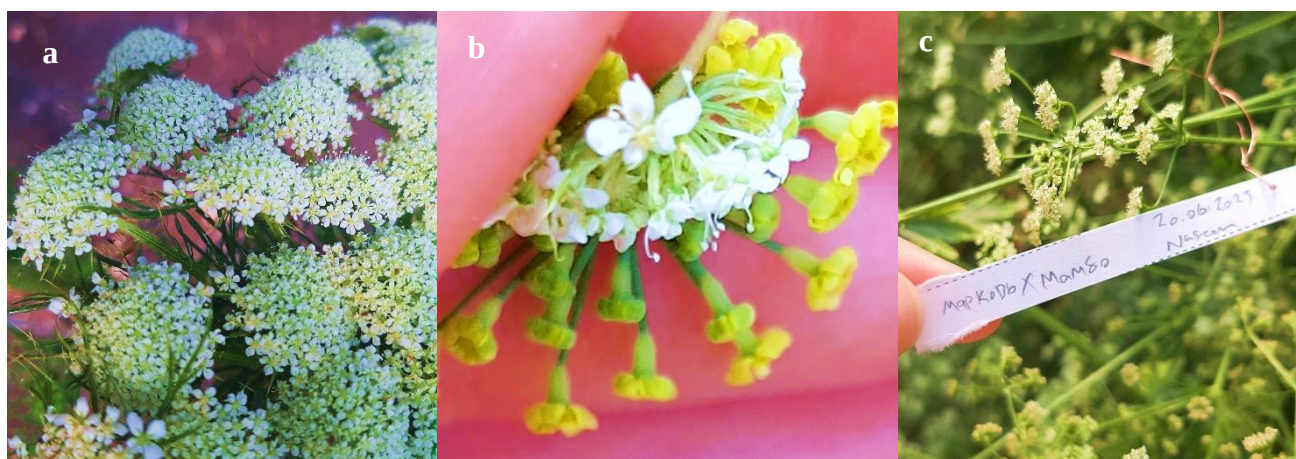


Рисунок – 8 а) Фертильные цветки моркови; б) опыление стерильных бутонов фенхеля фертильными цветками моркови; в) маркировка каждого опыленного соцветия

Через 10-30 дней после опыления (DAP) микроскопически изучались зонтики, чтобы оценить наличие сформировавшихся зародышей. Кроме того, некоторые из них оставляли на растениях для изучения возможности образования семян при естественном созревании.

Для преодоления барьера остановки развития гибридных зародышей использовали метод спасения зародыша. Зонтики собирали на 10-30 DAP, промывали в водопроводной воде в течение 5 минут, затем дезинфицировали в 2% активном растворе хлора в воде в течение 10 минут и пять раз ополаскивали стерильной дистиллированной водой. Затем их асептически вскрывали,

обнаруженные структуры, семязачатки, извлекали и культивировали в чашках Петри (диаметром 6 см), содержащих модифицированную среду MS (Murashige and Skoog, 1962). Первоначально их культивировали на модифицированной среде MS, содержащей фитогормоны (зеатин, кинетин, 2,4-D, гибберелловую кислоту, 6-бензиламинопурин (твердый и жидкий)). Большинство семязачатков культивировали непосредственно на средах, но некоторые из них препарировали и затем культивировали.

2.4 Соматическая гибридизация:

2.4.1 Изучение и разработка технологии выделения протопластов

Выделение протопластов проводили с использованием разных протоколов, чтобы получить максимальный выход протопластов. Затем был создан наш собственный протокол.

Протопласты были выделены из цитоплазматически мужски стерильного донора и растения-реципиента, способного к слиянию. Процесс выделения проводился с использованием различных растительных тканей. В данном исследовании использовались следующие подходы: Листья _ Каллус / Каллус _ Каллус / Листья _ Листья.

2.4.1.1 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов мезофилла

Данная процедура была повторена с использованием 3 различных протоколов и различных растворов в соответствии с рекомендациями.

На первом этапе протопласты мезофилла были выделены из полностью распустившихся, но молодых листьев растений. Листья разрезали на полоски шириной 1 мм, примерно 1 г, которые замачивали в 12 мл раствора для обработки клеток ферментами. В растворе для обработки ферментами клеток отсутствовала пектиназа. Концентрация целлюлазы, первоначально предложенная Sofiari et al., (1998), была изменена Wen et al., (2020) с 10 г/л до 750 мг л⁻¹. Аналогично, количество фермента также было увеличено с 200 до 750 мг л⁻¹. Остальная часть

исходного раствора оставалась неизменной. Ткани мезофилла инкубировали в растворе фермента в течение 16 ч при 24°C в темноте.

Обработанные ферментами ткани фильтровали через 45-мкм фильтр из нейлона для удаления непереваренных комков клеток и мусора. Фильтрат переносили в 10-мл центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли пипеткой Пастера. Осадок осторожно суспендировали в 1,0-1,5 мл 13%-ного раствора маннитола, содержащего питательные вещества клеточного и протопластного раствора CPW (27,2 мг/л KH_2PO_4 , 100 мг/л KNO_3 , 250 мг/л MgSO_4 , 0,2 мг/л KI , 150 мг/л CaCl_2 , 0,003 мг/л CuSO_4) (Frearson et al. 1973). Затем 13%-ный раствор маннитола, содержащий протопласты, медленно пипеткой приливали к 3-4 мл 26%-ного раствора сахарозы, содержащего питательные вещества CPW (избегая перемешивания), и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. На границе двух слоев обычно образуется слой жизнеспособных протопластов. Протопласты осторожно удаляли с границы раздела пипеткой Пастера и повторно суспендировали в соответствующем количестве раствора, содержащего 127,4 г/л маннитол и 27,75 мг/л CaCl_2 , а затем центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин.

На втором этапе протопласты выделяли из листьев с черешками от 3-4-недельных проростков моркови и гипокотилей от 2-недельных проростков по протоколу Baranski et al., (2007), модифицированному Grzebelus et al., (2012) с небольшими изменениями.

Около 1 г ткани помещали в стеклянную чашку Петри с 8 мл раствора для предварительного плазмолиза (0,5 М маннитол), разрезали на мелкие кусочки и инкубировали в течение 1 ч в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Обработку ферментами тканей проводили в течение ночи при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (30 об/мин) в ферментной смеси, состоящей из 1% (w/v) целлюлазы, 0,1% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl_2 и 0,6 М маннитола, pH 5,6, стерилизованного фильтрацией (0,22 мкм). Освобожденные протопласты отделяли от непереваренной ткани путем

фильтрации через нейлоновое сито 80 мкм и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Гранулы ресуспендировали в 8 мл 0,5 М сахарозы с 1 mM MES и заливали 2 мл среды W5 (Menczel et al. 1981). После центрифугирования при 145 g в течение 10 мин очищенные протопласты были локализованы в интерфазе между двумя растворами. Собранные протопласты промывали в растворе W5, затем в культуральной среде и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин после каждой промывки.

Наконец, согласно Meyer et al., (2022), 1 г листовой ткани из асептически выращенных проростков, полученных, как описано выше, помещали в чашку Петри, заполненную 4 мл раствора для плазмолиза (0,5 М маннитол, pH 5,6-5,8). Ткани листьев разрезали на мелкие кусочки (0,5 мм) с помощью нового лезвия хирургического скальпеля. После разрезания добавляли 8 мл дополнительного раствора для плазмолиза так, чтобы вся ткань была полностью покрыта раствором. Ткани инкубировали на гирационном шейкере при 10 об/мин при комнатной температуре в течение примерно 50 мин. После инкубации раствор для плазмолиза удаляли и заменяли 30 мл раствора фермента 2% (w/v) целлюлазы, 0,1% (w/v) пектиназа, 0,6 М маннитола, 10 mM 4-морфолинэтансульфоновой кислоты (MES), 10 mM CaCl₂, 0,8% (w/v) бычьего сывороточного альбумина, pH 5,6, который фильтровали с помощью шприцевого фильтра 0,45 мкм. Ткани инкубировали в течение ночи (15 ч) на гирационном шейкере при 30 об/мин при 24 °C в темноте. Протопласты отделяли от непереваренной ткани с помощью 100 мкм нейлонового сетчатого фильтра и центрифугировали при 100 × g в течение 5 мин 30 с при комнатной температуре в 15 мл пластиковой пробирке Falcon. Гранулы протопластов повторно суспендировали в 8 мл 0,5 М сахарозы, содержащей 1 mM MES (pH 5,8), и залили 2 мл раствора W5 (2 mM гидрата MES (pH 5,7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl). После центрифугирования при 150 × g в течение 11 мин 30 с при комнатной температуре очищенные протопласты собирали из интерфазы между двумя растворами и переносили в новую пробирку. К очищенным протопластам добавляли 25 мл ледяного раствора W5 и центрифугировали образцы в течение

5 мин 30 с при 100 ×g при комнатной температуре. Гранулы протопластов повторно суспендировали в 8 мл холодного раствора W5 и инкубировали на льду в течение 30-45 мин.

Подсчет протопластов проводили вручную с помощью счетной камеры гемоцитометра, Полная сетка на гемоцитометре (камера Нейбауэра) содержит девять квадратов, каждый из которых имеет площадь 1 мм². Центральная подсчетная область гемоцитометра содержит 25 больших квадратов, и каждый большой квадрат имеет 16 меньших квадратов / ячеек.

Подсчет проводился согласно приведенным ниже формулам (Pioli, 2019):

$$\text{Клетки/мл} = \left(\frac{\text{Всего подсчитано клеток}}{\text{Количество подсчитанных квадратов}} \right) \times \text{фактор разбавления} \times 10,000$$

При подсчете клеток фактор разведения является важным компонентом для точного определения концентрации клеток, особенно при использовании таких методов, как гемоцитометрия. Он в основном представляет собой отношение конечного объема разбавленного образца к первоначальному объему неразбавленного образца. Этот фактор используется для расчета плотности клеток оригинальной пробы на основе плотности разбавленной пробы, что обеспечивает представительство подсчитанных клеток по отношению к оригинальной клеточной популяции.

2.4.1.2 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток

Данная операция была повторена с использованием 3 различных протоколов, а также различных растворов в соответствии с рекомендациями после индукции каллуса и инициирования клеточной суспензии, которая является единой для всех последующих протоколов изоляции.

Сначала протопласты выделяли из 5-дневной суспензии клеток каллуса. Приблизительно 1 г ткани помещали в чашку Петри с 12 мл раствора для обработки клеток ферментами. Концентрация фермента была изменена в соответствии с исследованиями Wen et al., (2012) с небольшими изменениями, с 200 до 400 мг л⁻¹, и, аналогично, концентрация пектиназы была увеличена с 10

до 100 мг л⁻¹. Целлюлаза поддерживалась в концентрации 10 г л⁻¹. Суспензию тканей инкубировали в растворе фермента в течение 18 ч на шейкере при 40 об/мин при 24°C в темноте. «Переваренные» ткани фильтровали через 45-мкм фильтр из нейлона для удаления непереваренных комков клеток и мусора. Фильтрат переносили в 10-мл центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли пипеткой Пастера. Осадок осторожно суспендировали в 1,0-1,5 мл 13%-го раствора маннитола, содержащего питательные вещества в соответствии с моющим раствором для клеток и протопластов (CPW, 27,2 мг/л KH_2PO_4 , 100 мг/л KNO_3 , 250 мг/л MgSO_4 , 0,2 мг/л KI , 150 мг/л CaCl_2 , 0,003 мг/л CuSO_4) (Frearson et al. 1973). Затем 13%-ый раствор маннитола, содержащий протопласты, медленно пипеткой приливали к 3-4 мл 26%-го раствора сахарозы, содержащего питательные вещества CPW (избегая перемешивания), и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. На границе двух слоев формировался слой жизнеспособных протопластов. Протопласты осторожно удаляли с границы раздела пипеткой Пастера и повторно суспендировали в соответствующем количестве раствора, содержащего 127,4 г/л маннитол.

Затем протопласты выделяли из суспензионных культур в возрасте от 5 до 9 недель на 4-й день после субкультивирования по протоколу Grzebelus et al., (2012), модифицированному Bruznican et al., (2017). Около 1 г чистого веса суспензионных клеток инкубировали в 10 мл ферментного раствора, содержащего 0,5% (w/v) целлюлазы, 0,05% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl_2 и 0,6 М маннитола, и стерилизовали с использованием бактерицидного фильтра (0,2 мкм). Обработку ферментами проводили в течение ночи при 22 °C, осторожно встряхивая (30 об/мин) в темноте. После обработки ферментами протопласты просеивали через нейлоновые сита 100 мкм (Falcon) и 40 мкм, промывали 15 мл среды W5 (Menczel et al., 1981) и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Протопласты в грануле ресуспендировали в 10 мл 0,6 М сахарозы, поверх которой нанесли 1 мл среды W5. Образцы центрифугировали при 80 g в течение 10 мин, и

жизнеспособные протопласты, локализованные в интерфазе между двумя растворами, собирали и затем промывали в 10 мл среды W5 и 10 мл культуральной среды и центрифугировали при 100 g в течение 5 и 10 мин.

Наконец, пять граммов компактной нодулярной каллусной ткани собирали с субкультивированных пластин OsCIM2 и аккуратно измельчали краем металлического шпателя или скальпеля в глубокой чашке Петри с 15 мл раствора для обработки ферментами. Чашку Петри инкубировали в темноте в шейкере при комнатной температуре со скоростью 70 об/мин в течение 3 ч до появления молочного цвета раствора для обработки ферментами.

Заполненный протопластами раствор сначала фильтровали через нейлоновое клеточное сито Falcon 100 мкм в стерильной чашке Петри, а затем через нейлоновое клеточное сито Falcon 40 мкм (Millipore). Суспензию протопластов переносили в коническую пробирку объемом 50 мл и центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре при 150 g. Надосадочную жидкость сливали, а гранулы протопластов осторожно ресуспендировали в 8 мл раствора W5. Отдельно готовили свежую коническую пробирку объемом 50 мл с 10 мл 0,55 М сахарозы. Клеточную суспензию осторожно пипетировали на подушку из сахарозы так, чтобы она плавала сверху, затем центрифугировали при 1000 g без замедления в течение 5 мин.

На данном этапе процесс выделения можно было приостановить до последующих дней или продолжить сразу. Если была выдержана пауза, пробирку хранили при комнатной температуре, в вертикальном положении вдали от прямых солнечных лучей.

Промежуточную мутную фазу, содержащую живые протопласты, отбирали пипеткой и смешивали с 10 мл раствора W5 в свежих пробирках. Суспензию центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре при 150 g. Надосадочную жидкость удаляли, а гранулы осторожно ресуспендировали в 5 мл раствора MMG (Poddar et al., 2020).

2.4.2 Разработка протокола для изоляции протопластов мезофилла из проростков моркови

Из семян, стерилизованных по трехступенчатой процедуре, был получен асептический материал. Сначала семена инкубировали на водяной бане при 50°C, затем стерилизовали поверхность путем погружения в 95% этанол на 5 мин, а затем на 20 мин в 5% NaOCl, содержащий 2 капли Tween 20. Затем их 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Семена высевали на круглые чашки Петри диаметром 9 см, содержащие твердую среду MS, дополненную 30 г/л сахарозы и 6,5 г/л агара, и выдерживали при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте, при этом около 20 семян на чашку помещали на среду для проращивания.

Через 10 дней культивирования проростки переносили на регенерационную среду, состоящую из макро- и микроэлементов MS, 0,1 мг/л тиамина HCl, 0,1 мг/л пиридоксина HCl, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 3,0 мг/л глицина, 100 мг/л мио-инозитола, 20 г/л сахарозы и 2,5 г/л фитагеля согласно Grzebelus et al. (2011), культуры содержали в климатической комнате при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Протопласты выделяли из листьев с черешками выращенных *in vitro* 5-недельных проростков моркови линии Вилмарин ($2n=2x=18$).

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

Для этого около 1 г ткани помещали в чашку Петри, нарезанную на мелкие кусочки (рис. 9 а), с 8 мл раствора для предварительного плазмолиза (рис. 9 б) в качестве фазы предобработки (0,3, 0,5 и 1 М сорбит/маннит + 0,05 М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), повторяли три раза и инкубировали в течение 1/2 ч в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

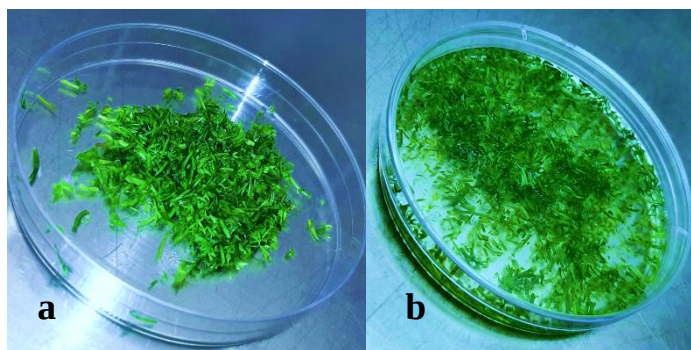


Рисунок – 9 а) 1 г ткани, нарезанные на мелкие кусочки; б) добавлен раствор для плазмолиза

Для оптимизации времени обработки ферментами ткани инкубировали в течение 2, 4 и 6 ч (три раза соответственно) при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (30 об/мин) в ферментной смеси, состоящей из 1%/0.5% (w/v) целлюлазы, 0,1%/0,5% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 М маннитола, pH 5,6, фильтрстерилизованной (0,22 мкм, Millipore).

7/10/15 мл раствора W5 добавляли в чашку Петри, осторожно встряхивая рукой в течение 1 мин, чтобы освободить протопласты, затем смесь фильтровали через нейлоновый фильтр 100 и 40 мкм (рис. 10 а) соответственно, оставшиеся в чашке кусочки листьев перемешивали и прижимали к стенкам чашки Петри с 3/5/7 мл W5, чтобы получить больше протопластов, и фильтровали, чтобы получить весь раствор.

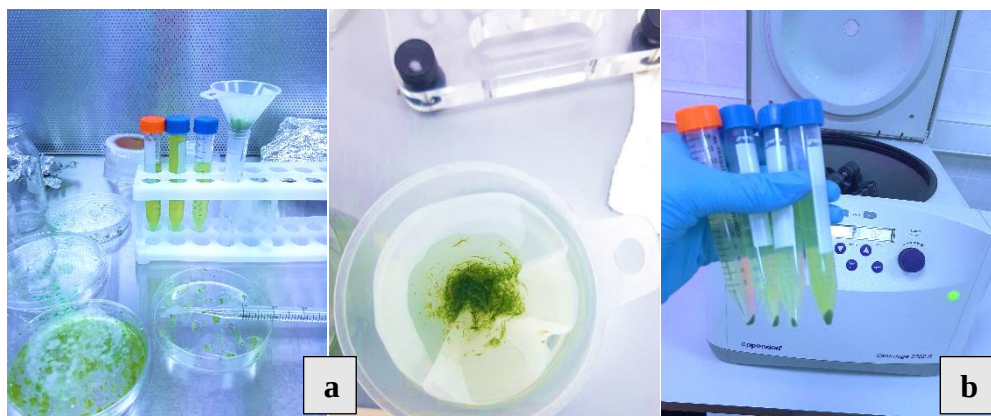


Рисунок – 10 а) фильтрация смеси через нейлоновую сетку; б) гранулы, содержащие протопласты, после центрифугирования

Раствор центрифугировали при 100/150/200 об/мин в течение 5/10/15 мин при комнатной температуре в роторе с качающимся ковшом (рис. 10 б), надосадочную жидкость сливали, а протопласты в грануле ресуспендировали в 2/3/5 мл 0.5 М маннитола два раза, затем собранные протопласты, оставшиеся в гранулах, суспендировали в 2/3/5 мл MMG раствора (содержащего 4 мМ MES-буфер pH 5,7, 0,6 М маннитол и 15 мМ MgCl₂).

Полученные протопласты разбавляли соответствующим образом и рассматривали под световым микроскопом, с помощью гемоцитометра определяли выход протопластов. В каждом образце проводилось не менее трех подсчетов клеток. Выход протопластов рассчитывали следующим образом: выход протопластов (протопласты/г FW) = количество протопластов, полученных при энзимоллизе/чистый вес материала, использованного при энзимоллизе (г FW). Расчеты приведены в таблице 2.

Жизнеспособность протопластов определяли с помощью флуоресцеин-диацетата (FDA). Жизнеспособность протопластов (%) определяли как (количество флуоресцирующих протопластов в поле зрения/общее количество протопластов в поле зрения) × 100%.

Хранение и структурирование экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2021, статистический анализ - с помощью программы PAST версии 2.17с. Для оценки значимости экспериментальных вариантов использовали критерий наименьшей значимой разницы (LSD) при уровне $p \leq 0,05$.

2.4.3 Протокол изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля

Асептический материал был получен из семян фенхеля (2n=2x=22), стерилизованных по той же процедуре, что и семена моркови, и высеян на 9 см круглые чашки Петри, содержащие твердую среду MS с витаминами (Murashige and Skoog 1962), дополненную 20 г/л сахарозы, 25 мг/л NaFeEDTA, 2 мг/л глицина и 6 г/л агара для культуры растительных тканей. Перед автоклавированием pH всех культуральных сред был отрегулирован до 5,8.

Пластины инкубировали при 24 ± 1 °C, чтобы простимулировать прорастание семян. Пятнадцатидневные проростки переносили в контейнеры с той же твердой средой.

2.4.3.1 Индукция каллуса

Экспланты листьев и черешков культивировали на среде MS, дополненной 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,5 мг/л 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), 0,5 мг/л кинетина и 7 г/л агара в соответствии с методикой Bruznican et al. (2018). Культуры содержали при 24 ± 1 °C в темноте, и рыхлые каллусы начали появляться через 12 дней, видимые каллусы отбирали и обновляли ежемесячно, пока они не достигали объема, подходящего для инициации клеточной суспензии.

2.4.3.2 Создание суспензии клеток

Суспензионные культуры клеток были получены путем культивирования 250 мг рыхлого каллуса фенхеля в 6 чашках Петри, содержащих 5 мл жидкой суспензионной среды на основе среды MS, дополненной 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,6 мг/л 2,4-D и 0,55 мг/л кинетина. Культуры инкубировали при 24 ± 1 °C в темноте при постоянном перемешивании (60 об/мин).

Через неделю после инициации каллус был удален из среды путем просеивания через стерильное сито 100 мкм. Культуры обновляли еженедельно, заменяя среду свежей жидкой культуральной средой, поддерживая постоянный объем культуры. Как только суспензия стабилизировалась и начала активно делиться, культуры еженедельно субкультивировали, разбавляя их 1:1 чистой жидкой культуральной средой.

2.4.3.3 Выделение и очистка протопластов

Протопласты выделяли из 5-9-недельных суспензионных культур на 4-й день после субкультивирования по протоколу Grzebelus et al. (2012) с некоторыми изменениями.

Около 1 г чистого веса суспензионных клеток нарезали на мелкие кусочки и инкубировали в 10 мл ферментного раствора, содержащего 0,5% (w/v) целлюлазы, 0,05% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl₂ и 0,6 М маннитола и стерилизовали на фильтре (0,2 мкм). Обработку ферментами проводили в течение ночи при 24±1 °С при осторожном встряхивании (30 об/мин) в темноте.

Затем протопласты фильтровали через нейлоновые сита 100 мкм и 40 мкм (рис. 11 а) и центрифугировали при 150 g в течение 10 минут в соответствии с методикой Aljaramany et al. (2024).

Жизнеспособные протопласты в полученной грануле (рис. 11 б) промывали 7 мл среды W5 (Menczel et al. 1981), затем дважды по 5 мл 0,6 М маннитол и центрифугировали после каждой промывки при 150 g в течение 8 минут.

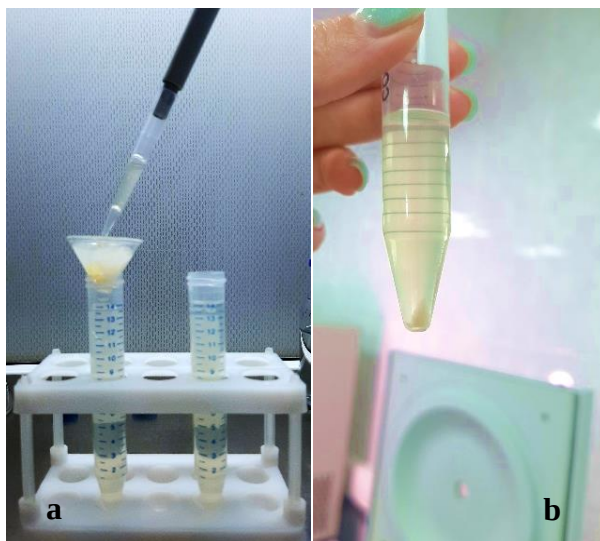


Рисунок – 11 а) Фильтрация смеси; б) Образование гранул после центрифугирования

Очищенные протопласты подсчитывали с помощью счетной камеры / гемоцитометра и разбавляли той же средой W5 до концентрации 1×10^5 протопластов на мл.

2.4.3.4 Выращивание и регенерация протопластов

Среда для культивирования протопластов представляла собой среду СРР (протопласт черешка моркови) (Dirks et al., 1996) с некоторыми модификациями.

Эта среда содержит те же макро- и микроэлементы, а также органические кислоты, которые были предложены Kao and Michayluk (1975), витамины, известные как B5, были добавлены согласно рекомендациям Gamborg et al., (1968). Кроме того, были добавлены 74 г/л глюкозы и 250 мг/л гидролизата казеина (рН 5,6). Культуры протопластов инкубировали при 24 ± 1 °C в темноте.

2.4.4 Создание цитоплазматических мужских стерильных гибридов/цибридов

Было проведено множество экспериментов по созданию гибридных растений с использованием двух основных методов: соматической гибридизации с помощью электро- или хемослияния и половой гибридизации с использованием ручного скрещивания моркови с родственными видами в сочетании с процедурами спасения зародышей.

Все эксперименты по слиянию проводились с клеточной линией моркови в качестве акцептора и протопластом фенхеля CMS в качестве донора. Протопласты акцептора и донора суспендировали в 0,5 М маннитоле при плотности 10^5 протопластов на 1 мл. Акцепторные и донорские протопласты смешивали в соотношении 1:1 морковь и фенхель.

2.4.4.1 Химослияние

Очищенные протопласты клеточной суспензии и протопласты мезофилла смешивали вместе в соотношении клеток примерно 1 : 1 в префузионном растворе (45 г маннитол, 36 г сорбита, 4,41 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,55 г KCl, 7,88 г Tris-HCl на литр, рН 7,2), который имел более высокое осмотическое давление (0,74 осмоль/кг). В этом растворе протопласты клеточной суспензии и протопласты мезофилла сохраняли стабильную круглую форму. Слияние протопластов проводили с небольшими изменениями в соответствии с методикой Ryschka et al. (2003) (названной Ry-m) следующим образом.

Смешанные протопласты помещали в пластиковую чашку Петри (диаметр 3 см), по 4 капли на чашку (рис. 12 а), 40 мкм/капля, и выдерживали в течение 5 мин, чтобы протопласты осели на дно чашки. В каждую каплю осторожно добавляли 60 мкм раствора ПЭГ (400 г ПЭГ, 54 г глюкозы, 7,35 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на

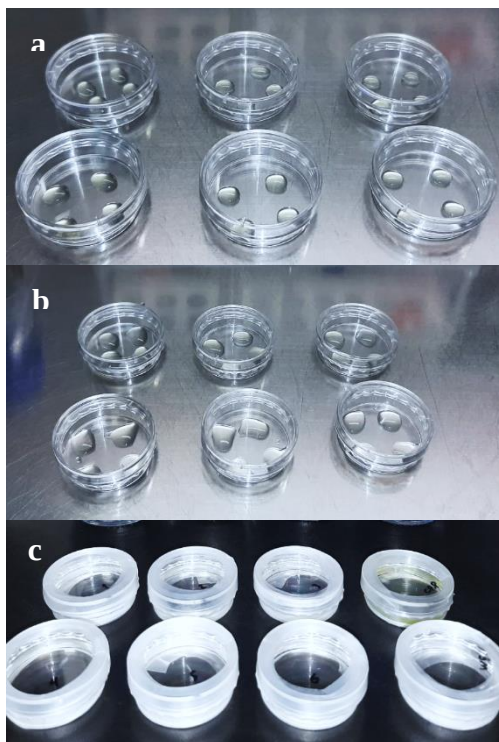


Рисунок – 12 а) Смешанные протопласты, 4 капли на блюдо; б) перемешивание капель при каждом добавлении, с. добавление культуры СРР для генерации литр, рН 7,0, фильтр стерилизованный 0,2 мкм), а через 5 мин осторожно добавляли 300 мкм раствора W5 с интервалом 5-10 мин в течение следующих 20 мин. После каждого добавления суспензию аккуратно перемешивали (рис. 12 б). и посуду оставляли неподвижной еще на 10-20 мин. Раствор снова сливали пипеткой, добавляли 1 мл раствора W5 и выдерживали суспензию еще 5 мин. Наконец, раствор W5 осторожно удаляли и добавляли 1 мл жидкой среды СРР (протопласт черешка моркови по Dirks et al., 1996) для выращивания протопластов (рис. 12 с).

2.4.4.2 Слияние по действием электрического тока

Электропорацию проводили с помощью системы Gene Pulser Xcell System BioRad, состоящей из основного блока, двух дополнительных модулей -

расширителя емкости (модуль CE) и контроллера импульсов (модуль PC), а также кюветной камеры ShockPod. Эта система предлагает выбор формы волны электрического поля (экспоненциальная или квадратная волна), выбор конфигурации системы и удобный интерфейс.

Модуль CE рекомендуется использовать с основным блоком Gene Pulser Xcell для электропорации большинства эукариотических клеток, включая протопласты растений.

Эксперименты по электропорации проводили по нескольким протоколам, руководствуясь наиболее актуальными библиографическими источниками. Процедуры выбирались с учетом их пригодности для конкретных условий эксперимента и характеристик образцов, подвергаемых электропорации.

250 мкл смеси протопластов пипетировали в кювету и подавали переменный ток (AC) напряжением 3,5 В в течение 40 с во время этапов выравнивания и после выравнивания. В промежутках между ними подавали 2 импульса постоянного тока (DC) напряжением 25 В в течение 60 мкс, чтобы вызвать слияние клеток. Для каждой смеси протопластов проводили 8-10 слияний, затем восстановленные клетки промывали в 10 мл среды CRR и центрифугировали в течение 15 минут при 100 g, 8°C.

Протопласты фенхеля/моркови, смешанные 1:1 в 0,6 М маннитоле и 2 mM CaCl₂ при конечной плотности 10⁵ протопластов/мл в общем объеме 200 мкл, частота выравнивания 20 МГц, напряжение 5 В/см и длительность поля выравнивания 45 сек, напряжение слияния 30 В с числом импульсов 2 ед. с интервалом 1 сек и длительностью импульса 90 мксек.

3 Результаты:

3.1 Скрининг цитоплазматической мужской стерильности у близкородственных видов *D. carota*

3.1.1 Фенотипические исследования флоральных структур в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея

Были визуально изучены и описаны цветочные характеристики, включая цвет лепестков, выступ завязи, форма лепестков и пыльников растений. Для обнаружения пыльцевых зерен цветки каждого растения тщательно собирали и рассматривали под микроскопом, что позволило детально изучить и проанализировать флоральные структуры. Были проведены наблюдения за цветочными признаками у растений с мужской стерильностью (МС) и фертильных растений. У растений сельдерея с МС преобладала светло-зеленая



Рисунок – 13 Цветочная детекция сельдерея, сорта Мамбо, Сейнния и Балина имеют атрофированные пыльники, в то время как сорт Танго имеет нормальные фертильные пыльники.

окраска и бело-желтоватая окраска лепестков. Варьирование по наличию светло-желтовато-зеленого цвета завязей также встречалось у МС образца сельдерея (рис. 13). У сорта Фенхель Драгон лепестки и завязи были желтыми (рис. 14).



Рисунок – 14 Цветочная детекция фенхеля, сорт Драгон имеет также мужскую стерильность, пыльники внешней нормальной морфологией не содержат фертильных пыльцевых зерен

У исследуемых образцов сельдерея с мужской стерильностью наблюдали различия в морфологии лепестков цветков, были выявлены образцы с ложкообразными лепестками, и образцы, имеющие продолговато-овальную форму лепестков. Лепестки ложкообразного типа демонстрировали сочетание прямых и изогнутых структур (Мамбо, Балина, Сейнния), в то время как лепестки продолговато-овального типа варьировали по форме от широких (Драгон) до узко-продолговатой формы (Танго). Наблюдаемые различия в морфологии и окраске завязей могут быть связаны с генетическими особенностями цитоплазматических мужских стерильных линий, что заслуживает дальнейшего изучения. Кроме того, внутрипопуляционная изменчивость была очевидна в линиях ЦМС по многочисленным цветочным признакам, включая размер растений, цвет и форму зонтиков, частоту фертильных цветков в зонтиках и пигментацию лепестков. Эти результаты указывают на потенциальные возможности для повышения однородности этих характеристик.

Согласно фенотипическим наблюдениям, три сорта сельдерея (Мамбо, Сейнния, Балина) демонстрируют стерильность (рис. 13), все они имеют атрофированные пыльники, вероятно, тычинки целиком. У сорта фенхеля

(Драгон) также наблюдалось проявление стерильности, однако пыльники имеют нормальное нередуцированное строение (рис. 14).

У моркови мужская фертильность фенотипически может быть охарактеризована несколькими отличительными признаками, включая



Рисунок – 15 а) Пыльник моркови, содержащий фертильные пыльцевые зерна; б) Фертильные пыльцевые зерна внутри пыльника при окрашивании ацетокармином

производство нормальных пыльцевых зерен, нормальную структуру пыльников и отсутствие аномальных цветочных структур (рис.15). И наоборот, мужская стерильность может быть распознана по наличию сморщенной, слегка окрашенной пыльцы, деформированной структуре пыльников.

3.1.2 Молекулярно-генетические исследования типов ЦМС в генетической коллекции моркови, фенхеля и сельдерея

В данном исследовании оценивается, обладают ли генетические ресурсы сельдерея и фенхеля признаком мужской стерильности в результате возможных предшествующих гибридизационных событий с морковью.

Данные электрофореза показали, что ни сельдерей, ни фенхель не имеют молекулярных маркеров мужской стерильности характерные для моркови, что является важным результатом. Три образца сельдерея, а именно "Мамбо", "Сейнния" и "Балина", а также сорт фенхеля "Дракон", были фенотипически

идентифицированы как стерильные. Эти образцы растений с ЦМС могут быть использованы в качестве доноров протопластов для дальнейших экспериментов по слиянию с протопластами моркови. Идентификация этих стерильных растений представляет собой ценный ресурс для последующих исследований и экспериментов, поскольку они могут служить потенциальными источниками протопластов для различных применений.

Использование этих идентифицированных стерильных гибридов в качестве доноров ЦМС открывает интересный и инновационный путь для улучшения сельскохозяйственных культур семейства *Ariaseae*, позволяя создавать беспрецедентные комбинации желательных признаков, которые невозможно было бы получить с помощью традиционных методов селекции, особенно если учесть сложность интрогрессии генов.

В соответствии с используемыми праймерами:

- маркер S- и N-типа цитоплазмы моркови (*D. carota* L.), амплифицируемый с праймерами (смт-1 и смт-2) показывает, что в образцах моркови с цитоплазматической мужской стерильностью полоса на уровне 320

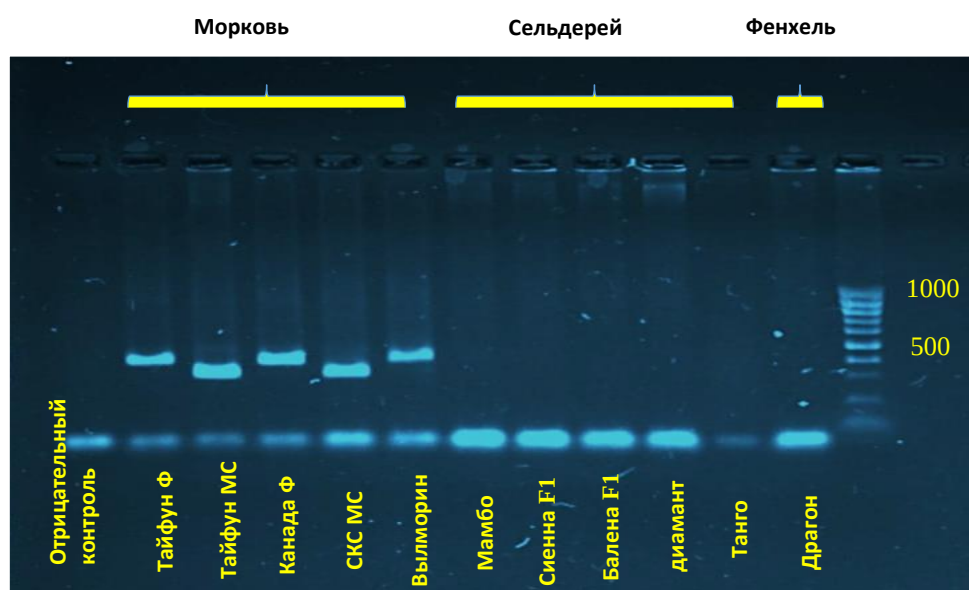


Рисунок – 16 результаты электрофореза с праймерами *cmt1-cmt2*, ожидаемый фрагмент ДНК моркови фертильного типа ЦМС составляет 390 п.н., для фенотипа петалоидной мужской стерильности - 320 п.н.

п.н., а в фертильных образцах с нормальной цитоплазмой полоса на уровне 390 п.н.

В данном случае только морковь показала результаты в соответствии с ожидаемыми, так как были предложены праймеры для идентификации ДНК моркови. Маркеры стерильного и нормального типа цитоплазмы моркови не амплифицировались ни у одного образца сельдерея и фенхеля, независимо от того фертильны они или обладали мужской стерильностью. Первая линия Тайфун фертильна с уровнем полосы 390 п.н. Вторая линия Тайфун стерильна с уровнем полосы 320 п.н. Линия Канада также фертильна с уровнем полос 390 п.н., как и Вильмарин. И, наконец, СКС стерильна с уровнем полосы 320 п.н. (рис. 16).

- маркер S- и N-типа цитоплазмы моркови (*D. carota* L.), амплифицируемый с праймерами (atp1-d1 и cmt-3) имеет полосу в образцах с петалоидной цитоплазмой 1630 п.н. В результате вторая линия Тайфун демонстрирует стерильность петалоид с уровнем полосы 1630 п.н. (рис. 17).

- маркер S- и N-типа цитоплазмы моркови (atp1-d1 и cmt-4) показывают полосу в образцах с нормальной цитоплазмой 1608 п.н. Следовательно, первая линия Тайфун имеет нормальную фертильную цитоплазму с уровнем полосы 1608 п.н. (рис. 17).

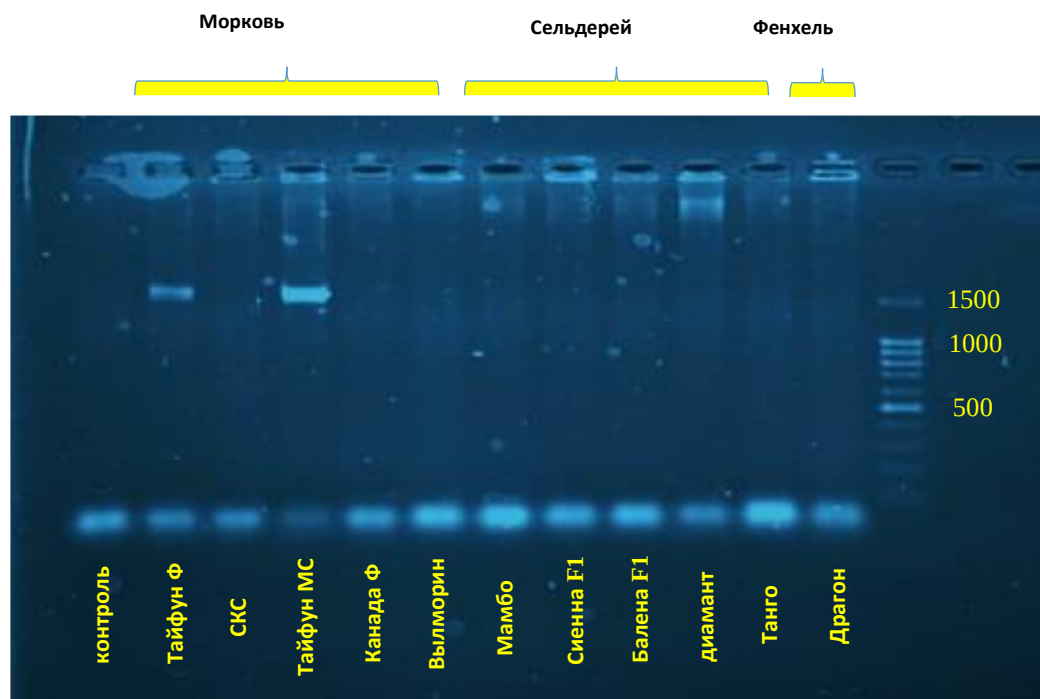


Рисунок – 17 Результаты электрофореза с использованием пар cmt3- apt1d1 и cmt4-atp1d1, ожидаемый фрагмент ДНК морковной петалидной стерильности ЦМС составляет 1630 п.н. для мужского стерильного фенотипа и 1608 п.н. для мужского фертильного фенотипа

Согласно результатам электрофореза пара праймеров cmt1-cmt2 позволила дифференцировать ЦМС и фертильные образцы моркови *D. carota*, использованные в анализе. Тогда как пары праймеров cmt3-atp1d1 и cmt4- atp1d1, не позволили амплифицировать маркеры стерильности и фертильности у большей части образцов моркови (СКС, Канада, Вильмарин).

Использование пары праймеров cmt1-cmt2 указывает как на признаки фертильности, так и стерильности с разными размерами ампликонов, поэтому использовалась традиционная ПЦР. Напротив, пары праймеров cmt3-atp1d1 «нормальная цитоплазма» и cmt4-atp1d1 «стерильная цитоплазма» были

проанализированы с помощью мультиплексной ПЦР, которая позволяет амплифицировать несколько ДНК-мишеней одновременно.

3.2 Анализ митохондриальной ДНК ЦМС-образца моркови

В этом исследовании сравнивали амплифицированные локусы мтДНК, связанные с ЦМС, наблюдаемые в наших экспериментах у образца моркови (рис. 18), с общемировыми данными базового секвенирования для подтверждения целевого участка ДНК, ответственного за ЦМС у моркови. Сравнение данных секвенирования помогают понять генетические механизмы, лежащие в основе ЦМС у этого важного вида сельскохозяйственных культур.

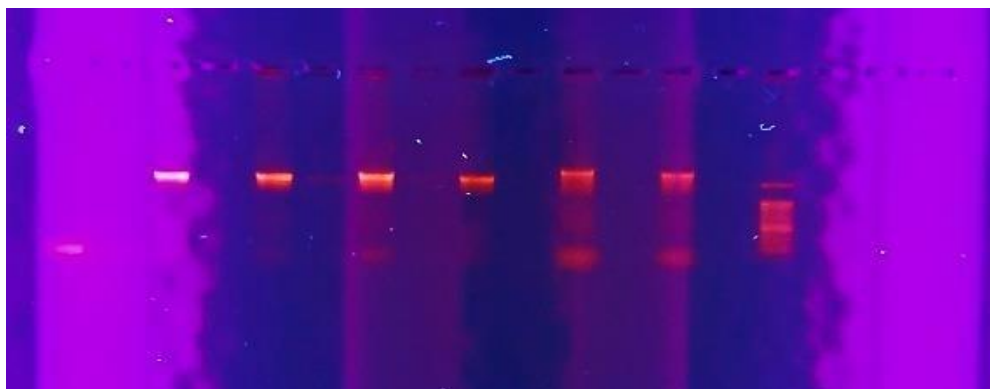


Рисунок – 18 Полосы ЦМС в результате гель-электрофореза

Результаты секвенирования, полученные при использовании праймера atp1-d1 (рис. 19):

```
GAGCCCTTAGCGATCACGAGCGAGACGTGTCTGAAGTGAAGCCCCTGGGA
TTATTGAACGTAAATCTGTGCACGAGCCTATGCAAACAGGGTTAAAAGCG
GTAGATAGCCTGGTTCCTATAGGCCGTGGTCAACGAGAACTTATAATCGG
GGACCGACAAACTGGAAAAACAGCAATTGCTATCGATACCATATTTAAAC
CAAAAGCAAATGAACTCAAGGAGCACCTCTGAGAGTGAGACATTGTATT
GTGTCTATGTAGCGATTGGACAGAAACGCTCAACTGTGGCACAATTAGTT
CAAATTCTTTCAGAAGCGAATGCTTTGGAATATTCCACGTCTTGTAGCAG
CCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCTGCAATTTCTGGCCCCATATTCGGGGT
GTGCCATGGGGGAATATTTCCGTGATAATGGAATGCACGCATTAATAATC
TATGATGATCTTAGAAAACAGGCGGTGGCATATCGACAAATGTCATTATT
```

GTTACGCCGACCACCAGGCCGTGAGGCTCGTCCCAGGGGATGTTTTCTAT
TTACATTCC.

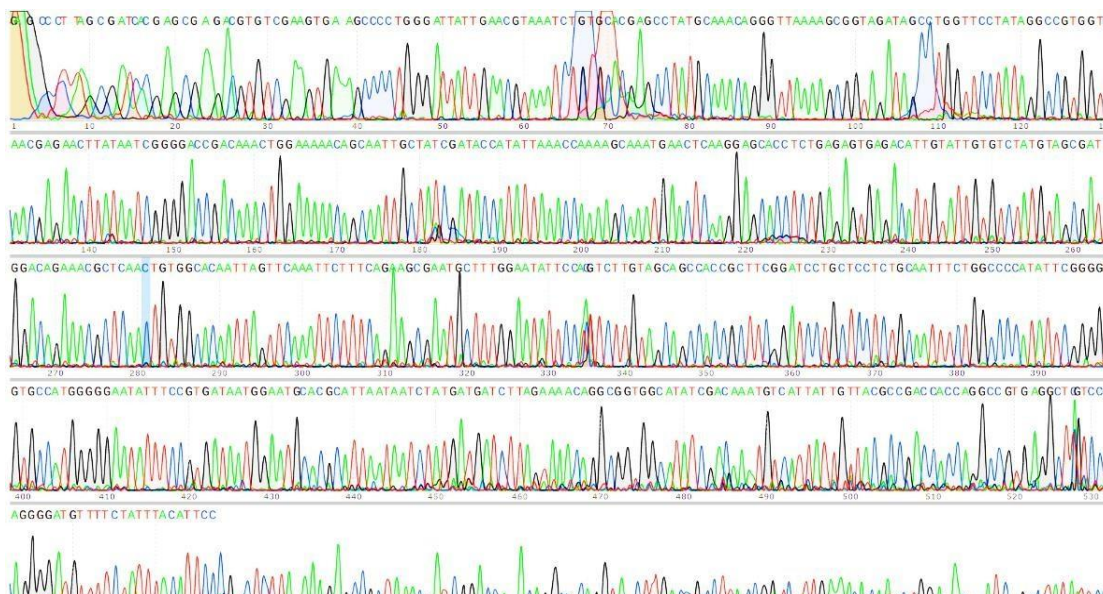


Рисунок – 19 Данные хроматограммы праймера atp1-d1

Согласно NCBI (The National Center for Biotechnology Information) с помощью BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), который находит области сходства между биологическими последовательностями для сравнения нуклеотидных последовательностей с последовательностями базы данных и вычисляет статистическую значимость совпадений, было обнаружено (GenBank: AF301602.1), что наши результаты секвенирования (длина запроса 557) являются на 98,20% идентичными гену *Daucus carota* ATP1 (atp1), аллель atp1-Sp, полный cds; митохондриальный ген для митохондриального продукта.

Результаты секвенирования, полученные при использовании праймера ctm-3 (рис. 20):

TGAAAGATCATCAGATGGTTGATCATTACCCAGAGAGAGGTGTGCA
ACCTTATCGGGTAATCTAGTTAACCCGATGTCAGAATATTTTTCTTGAGAA
AAGCTATCGTAGATCTCATATTCCGACTGGTGGTATAACGATATAGCAAA
GCAGAGACTGAAGGAGCAACATGTGATGTAGATACATACGAACAGATCA
TATTCATTGTAACGTTTTCTAAGATAGAGTAATAAGATTGGTTTTTGGAAA
CGATCCCACCCTATTATTGCATATATGGATATATATGTATACTATACTAGC

ATCCTTTTAGATAAGTAAGCTTAGAGGGTGTTCAGTCGGCGAAGCCTC
 TTCTGTTCTCAGTTGGCGAGAAATCTACGTTTGTGATTAAGTCTATGCATC
 ATTGGTAATTATTTTAAAAGCGCTTTCTTTTAAGAATGCATCTGGTTCCAT
 CTTTCTTTCGTTAGTTAAACCACCTTTTTCTAACAGTTTTTGTAGTAATTCT
 GGTATTATAAGACTTGTAATTACTTTTTCAAATTGTTCAATTTTTCTAGTG
 GCATTCGATCACAGAATCCATTGACAGCTGCATAAATGACTAGAATTTGT
 TTTTCAATTGGAAGTGGTGCATATTGTGGTTGTTTCGGTACTTCTGTAAGC
 CTTGCACCTCTATTGAGTAATGCCTGAGTCGCAGCATCAAGGTCTGACCC
 AAAATTGAGCAAGGGCGGCCACTTCGCGAATATTGTGCCAATTCAGTTTT
 TGATCTACCGCAGACTTGTTTCATATTTTTCAACTGAACGGC.

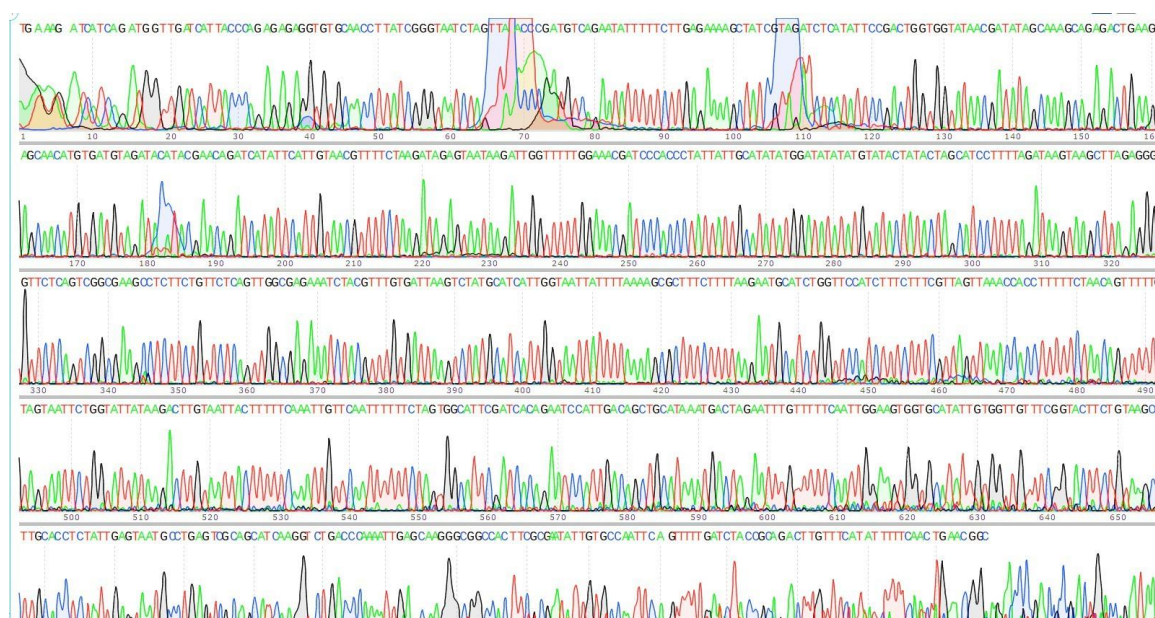


Рисунок – 20 Данные хроматограммы праймера ctm-3

Согласно NCBI (The National Center for Biotechnology Information) с помощью BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), который находит области сходства между биологическими последовательностями. для сравнения нуклеотидных последовательностей с последовательностями базы данных и вычислить статистическую значимость совпадений, было обнаружено (GenBank: AF301602.1), что наши результаты секвенирования (длина запроса 797) являются 98,74% идентичен гену *Daucus carota* ATP1 (atp1), аллель atp1-Sp, полный cds (Кодирующая последовательность ДНК); митохондриальный ген для митохондриального продукта.

3.3 Половая отдаленная гибридизация

Эксперимент проводили в течение двух сезонов – весной 2023 и 2024 годов. В первый год было опылено 24 ед. зонтиков сельдерея и 8 ед. фенхеля пыльцой моркови. Для спасения зародышей использовали 18 ед. опыленных сельдерейных зонтиков, содержащих 684 плодов, и 6 ед. опыленных пыльцой моркови зонтиков фенхеля, содержащих 102 плода.

В последующий год опылено 28 ед. зонтиков сельдерея и 11 ед. фенхеля пыльцой моркови. Для спасения зародышей использовали 23 ед. соцветий сельдерея, содержащих 828 плодов, и 9 ед. соцветий фенхеля, содержащих 144 плодов.

Остальные опыленные зонтики были оставлены на растениях для естественного развития и созревания, но ни один из них не дал семян. Количество плодов в зонтиках и семязачатках представлено в таблице 1. Важно отметить, что для спасения зародышей отбирались только здоровые, хорошо сформированные плоды.

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

Согласно результатам, приведенным в таблице, перекрестное опыление фенхеля морковью привело к формированию количества семязачатков с примерно в 4 раза большей частотой по сравнению с сельдереем.

Для преодоления постзиготической несовместимости и сохранения жизнеспособности гибридных зародышей использовали метод спасения зародышей (embryo rescue) в культуре изолированных семязачатков. Плоды изолировали на 10-30 день после опыления (DAP) (рис. 21).

После поверхностной стерилизации, их вскрывали, извлекали завязь. Из завязей изолировали семязачатки и культивировали в чашках Петри (диаметром 6 см), содержащих различную модифицированную среду MS.

Первоначально их культивировали в соответствии со схемой эксперимента:

- модифицированная среда MS (Murashige and Skoog, 1962) (твердая и жидкая), содержащая фитогормоны (зеатин, кинетин, 2,4- D, гибберелловую кислоту, 6-бензиламинопурин) (Jong et al. 1993), во втором варианте на среде MS твердая и жидкая (Murashige and Skoog, 1962) без добавок.

Большинство семязачатков культивировали непосредственно на питательной среде, но некоторые из них надрезали, а затем культивировали.



Рисунок – 21 Изолированные из цветков фенхеля (a) и сельдерея (b) завязи через 18 дней после опыления морковью

Изолированные семязачатки надсеченные и цельные завязи фенхеля и сельдерея с цветков, опыленных пылью моркови, при культивировании в чашках Петри на модифицированной питательной среде, но ни одна из них не подавала признаков роста (рис. 22).

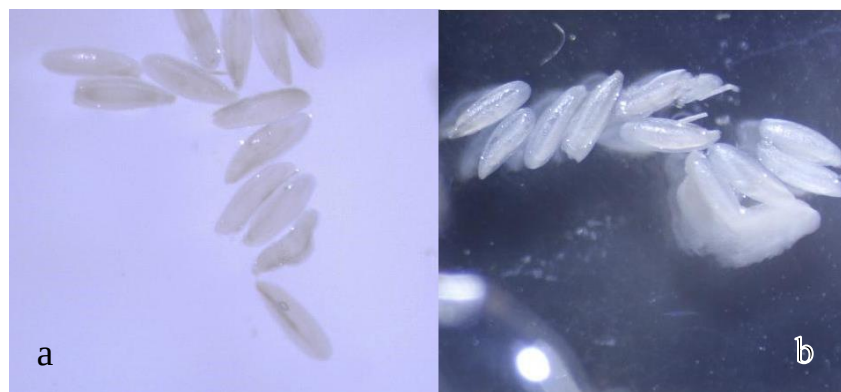


Рисунок – 22 Изолированные семязачатки фенхеля (а) и сельдерея (б) через 30 дней инкубирования в жидкой питательной среде MS *in vitro*

Выделенные структуры не пролиферировали при культивировании в различных средах и не демонстрировали ни прямого, ни непрямого развития.

В этом случае метод отдаленной гибридизации не дал никаких благоприятных результатов, поэтому в дальнейшем мы продолжили соматическую гибридизацию путем слияния протопластов.

3.4 Соматическая гибридизация:

3.4.1 Изучение и разработка технологии выделения протопластов

Протопласты были выделены из цитоплазматического мужского стерильного растения-донора и растения-реципиента, которые обладают способностью к слиянию и гибридизации клеток.

3.4.1.1 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов мезофилла

Протокол, первоначально предложенный Sofiari et al., (1998), модифицированный Wen et al., (2020), был использован в нашем исследовании с небольшими модификациями. Протопласты мезофилла были выделены из полностью распустившихся, но молодых листьев растений. Листья разрезали на полоски шириной 1 мм, примерно 1 г, замачивали в 12 мл раствора для обработки клеток ферментами. Пектиназа в растворе для обработки ферментами клеток отсутствовала. Концентрация целлюлазы, первоначально предложенная Sofiari

et al., (1998), была изменена по Wen et al., (2020) с 10 г л⁻¹ до 750 мг л⁻¹. Аналогично, количество фермента также было увеличено с 200 до 750 мг л⁻¹. Остальная часть исходного раствора ферментов оставалась неизменной. Ткани мезофилла инкубировали в растворе фермента в течение 16 ч при 24°C в темноте.

Обработанные ферментами ткани растений фильтровали через 45-мкм фильтр из нейлона для удаления непереваренных клеточных комков и мусора. Фильтрат переносили в 10-мл центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли пипеткой Пастера. Осадок осторожно суспендировали в 1,0-1,5 мл 13%-го раствора маннитола, содержащего питательные вещества моющего раствора для клеток и протопластов CPW (27,2 мг/л KH_2PO_4 , 100 мг/л KNO_3 , 250 мг/л MgSO_4 , 0,2 мг/л KI , 150 мг/л CaCl_2 , 0,003 мг/л CuSO_4) (Frearson et al. 1973). Затем 13%-й раствор маннитола, содержащий протопласты, медленно пипетировали на 3-4 мл 26%-го раствора сахарозы, содержащего питательные вещества CPW (избегая перемешивания), и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. На границе двух слоев образовывался тонкий слой жизнеспособных протопластов (рис. 23 а). Протопласты осторожно удаляли с границы раздела пипеткой Пастера и ресуспендировали в соответствующем количестве раствора, содержащего 127,4 г л⁻¹ маннитола и 27,75 мг л⁻¹ CaCl_2 .

Затем ресуспендированные протопласты центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин, чтобы отделить их от раствора. Однако, как показали

подсчеты, выделенные протопласты показали более низкий выход, чем ожидалось (рис. 23 б. с).

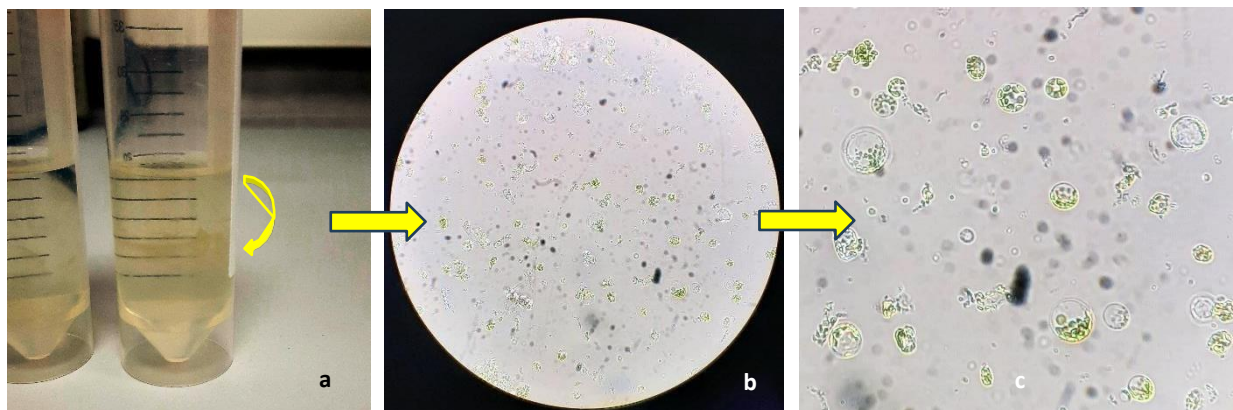


Рисунок – 23 а) Интерфазные протопласты; б) изолированные протопласты; с) те же протопласты при увеличении по протоколу Wen et al.(2020)

В этой связи был проведен анализ эффективности выделения протопластов основываясь на протоколе, первоначально предложенном Baranski et al., (2007) и модифицированным Grzebelus et al., (2012).

Протопласты выделяли из листьев с черешками от 3-4-недельных проростков моркови и гипокотилей от 2-недельных проростков согласно протоколу Baranski et al., (2007), модифицированному Grzebelus et al., (2012). Около 1 г ткани помещали в стеклянную чашку Петри с 8 мл раствора для предварительного плазмолиза (0,5 М маннитол), нарезали на мелкие кусочки и инкубировали в течение 1 ч в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Обработку тканей ферментами проводили в течение ночи при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (30 об/мин) в ферментной смеси, состоящей из 1% (w/v) целлюлаза, 0,1% (w/v) пектиназа, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl_2 и 0,6 М маннитол, pH 5,6, фильтр-стерилизатор (0,22 мкм). Освобожденные протопласты отделяли от непереваренной ткани путем фильтрации через нейлоновой фильтр 80 мкм и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин.

Осадок ресуспендировали в 8 мл 0,5 М сахарозы с 1 мМ MES и заливали 2 мл среды W5 (Menczel et al., 1981). После центрифугирования при 145 g в течение 10 минут на границе раздела двух растворов были обнаружены очищенные протопласты. Полученные протопласты (рис. 24) промывали в растворе W5, а затем в культуральной среде, с центрифугированием при 100 g в течение 5 минут после каждого этапа промывки, что привело более высокому выходу собранных протопластов.

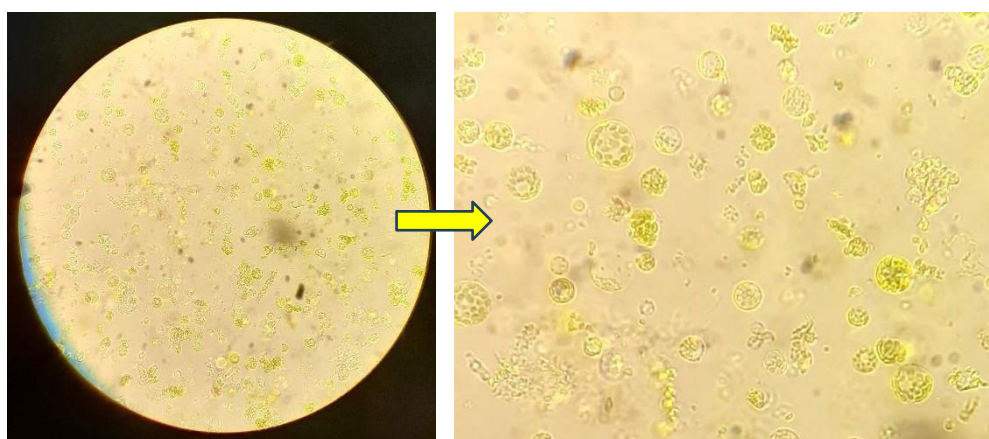


Рисунок – 24 Изолированные протопласты по протоколу Grzebelus et al., (2012)

Протокол, первоначально предложенный Meyer et al., (2022): 1 г листовой ткани из асептически выращенных проростков, полученных, как описано выше, помещали в чашку Петри, заполненную 4 мл раствора для плазмолиза (0,5 М маннитол, pH 5,6-5,8). Ткани листьев разрезали на мелкие кусочки (0,5 мм) с помощью лезвия чистого хирургического скальпеля. После разрезания добавляли 8 мл дополнительного раствора для плазмолиза, чтобы вся ткань была полностью покрыта раствором. Ткани инкубировали на гирационном шейкере при 10 об/мин при комнатной температуре в течение примерно 50 мин. После инкубации раствор для плазмолиза удаляли и заменяли 30 мл раствора фермента 2% (w/v) целлюлаза, 0,1% (w/v) пектиназа, 1% 0,6 М маннитол, 10 мМ 4-морфолинэтансульфоновая кислота (MES), 10 мМ CaCl₂, 0,8% (w/v) бычий сывороточный альбумин, pH 5,6, отфильтрованный с помощью шприцевого

фильтра 0,45 мкм. Ткани инкубировали в течение ночи (15 ч) на гирационном шейкере при 30 об/мин при 24 °С в темноте.

Протопласты отделяли от непереваренной ткани с помощью нейлонового сита с ячейками 100 мкм и центрифугировали при 100× g в течение 5 мин 30 с при комнатной температуре в 15 мл пластиковую пробирку Falcon. Гранулы протопластов повторно суспендировали в 8 мл 0,5 М сахарозы, содержащей 1 mM MES (pH 5,8), и залили 2 мл раствора W5 (2 mM гидрата MES (pH 5,7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl). После центрифугирования при 150 g в течение 11 мин 30 с при комнатной температуре очищенные протопласты собирали из интерфазы между двумя растворами и переносили в новую пробирку. К очищенным протопластам добавляли 25 мл ледяного раствора W5 и центрифугировали образцы в течение 5 мин 30 с при 100 g при комнатной температуре. Гранулы протопластов повторно суспендировали в 8 мл холодного раствора W5 и инкубировали на льду в течение 30-45 мин. Протопласты, полученные с помощью этого метода, были неоптимальными и оказались непригодными для растений семейства *Apiaceae* с низким качеством и количеством (рис. 25).

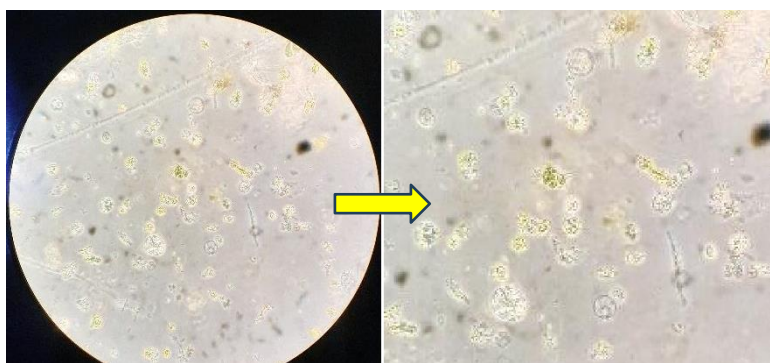


Рисунок – 19 Протопласты, выделенные по протоколу Meyer et al., (2022)

Чтобы проиллюстрировать результаты предыдущей изоляции, была составлена следующая таблица 2 (табл. 2):

Таблица – 2 Плотность выделенных протопластов мезофилла в соответствии с различными протоколами, Средняя плотность протопластов (протопластов на миллилитр), Успешность изоляции в зависимости от жизнеспособности.

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%

Из предыдущей таблицы видно, что все три протокола дают низкие результаты по плотности протопластов, считающейся недостаточной для процессов слияния или регенерации, так как приемлемая плотность составляет не менее 10^5 протопластов на миллилитр. Кроме того, хотя метод, описанный Bruznican et al., (2007), позволил получить наибольшее количество изолированных протопластов, процент жизнеспособных протопластов был ниже по сравнению с другими протоколами.

В результате мы пришли к выводу, что необходим новый подход. Поэтому мы разработали свой собственный протокол, чтобы устранить недостатки предыдущего метода и получить метод протопластов, лучше подходящий для использования с растениями семейства *Apiaceae*.

3.4.1.2 Оптимизация протокола для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток

Протокол, первоначально предложенный Wen et al., (2012). Каллусные протопласты выделяли из 5 недель суспензии клеток. Приблизительно 1 г ткани помещали в чашку Петри с 12 мл раствора для обработки клеток ферментами. Концентрация фермента была изменена в соответствии с Wen et al., (2012), с 200 до 400 мг/л и, аналогично, пектиназа была увеличена с 10 до 100 мг/л. Целлюлаза

поддерживалась в концентрации 10 г/л. Суспензию тканей инкубировали в растворе фермента в течение 18 ч на шейкере при 40 об/мин при 24°C темноте. Переваренные ткани фильтровали через 45-мкм фильтр из нейлона для удаления непереваренных клеточных комков и мусора. Фильтрат переносили в 10-мл центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин.

Надосадочную жидкость удаляли пипеткой Пастера. Осадок осторожно суспендировали в 1,0-1,5 мл 13%-го раствора маннитола, содержащего питательные вещества Cell and Protoplast Solution CPW (27,2 мг/л KH_2PO_4 , 100 мг/л KNO_3 , 250 мг/л MgSO_4 , 0,2 мг/л KI , 150 мг/л CaCl_2 , 0,003 мг/л CuSO_4) (Frearson et al., 1973). Затем 13%-ный раствор маннитола, содержащий протопласты, медленно пипетировали на 3-4 мл 26%-го раствора сахарозы, содержащего питательные вещества CPW (избегая перемешивания), и центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. На границе двух слоев образовывалась полоса жизнеспособных протопластов (рис. 26 а). Протопласты аккуратно удаляли с поверхности пипеткой Пастера и повторно суспендировали в соответствующем количестве раствора, содержащего 127,4 г л⁻¹ маннитола и 27,75 мг л⁻¹ CaCl_2 , а затем центрифугировали в течение 6 мин при 960 об/мин. Однако в результате подсчета выяснилось, что выделенные протопласты показали выход ниже ожидаемого (рис. 26 б).

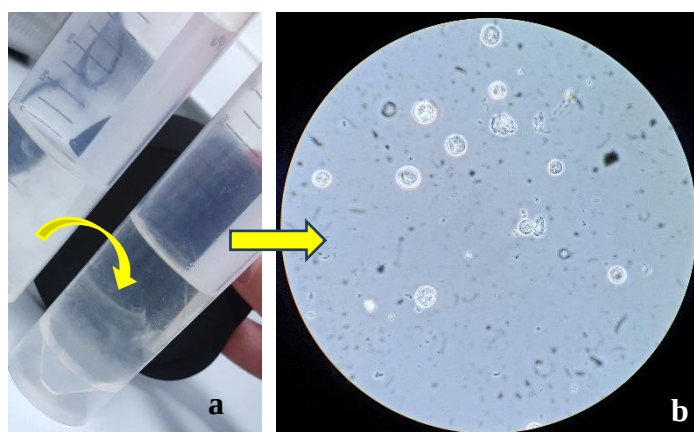


Рисунок – 26 а) Интерфазные протопласты; б) Изолированные протопласты по протоколу Wen et al., (2012)

Протокол, первоначально предложенный Grzebelus et al., (2012), модифицирован Bruznican et al., (2017): протопласты были выделены из 5-9-недельных суспензионных культур на 4-й день после субкультивирования по протоколу Grzebelus et al., (2012), модифицированному Bruznican et al., (2017). Около 1 г чистого веса суспензии клеток инкубировали в 10 мл ферментного раствора, содержащего 0,5% (w/v) целлюлазы, 0,05% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl₂ и 0,6 М маннитола, и стерилизовали на фильтре (0,2 мкм). Обработку ферментами проводили в течение ночи при 22 °С при осторожном встряхивании (30 об/мин) в темноте. После обработки ферментами протопласты просеивали через нейлоновые сита 100 мкм (Falcon) и 40 мкм, промывали 15 мл среды W5 (Menczel et al. 1981) и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Протопласты в грануле ресуспендировали в 10 мл 0,6 М сахарозы, на которую накладывали 1 мл среды W5. Образцы центрифугировали при 80 g в течение 10 мин. Жизнеспособные протопласты, локализованные в интерфазе между двумя растворами, собирали и затем промывали в 10 мл среды W5 и 10 мл культуральной среды и центрифугировали при 100 g в течение 5 и 10 мин.

Был зафиксирован более высокий выход собранных протопластов (рис. 27).

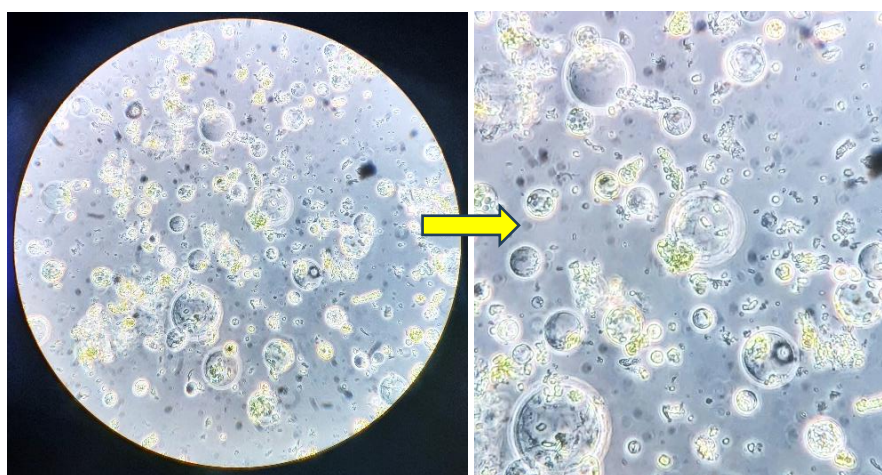


Рисунок – 20 Протопласты, выделенные по протоколу Bruznican et al., (2017)

Протокол, первоначально предложенный Poddar et al., (2020), пять граммов компактной, узловатой каллусной ткани собирали с субкультивированных пластин OsCIM2 и аккуратно измельчали краем металлического шпателя или скальпеля в глубокой чашке Петри размером 25× 100 мм с 15 мл раствора для обработки ферментами. Чашку Петри инкубировали в темноте в шейкере при 70 об/мин в течение 3 ч, пока раствор для Обработанные ферментами не растворялся и не становился молочного цвета. Наполненный протопластами раствор для обработки ферментами сначала фильтровали через нейлоновое клеточное сито Falcon 100 мкм в стерильной чашке Петри, а затем через нейлоновое клеточное сито Falcon 40 мкм (Millipore). Раствор протопластов переносили в коническую пробирку объемом 50 мл и центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре при 150 g. Надосадочную жидкость отбрасывали, а гранулы протопластов осторожно ресуспендировали в 8 мл раствора W5. Отдельно была подготовлена свежая коническая пробирка объемом 50 мл с 10 мл 0,55 М сахарозы. Клеточную суспензию осторожно пипетировали на сахарозную подушку так, чтобы она плавала сверху, затем центрифугировали при 1000 g без замедления в течение 5 мин. Промежуточную мутную фазу (рис. 28 а), содержащую живые протопласты, отбирали пипеткой и смешивали с 10 мл раствора W5 в свежих пробирках. Суспензию центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре при 150 g. Надосадочную жидкость удаляли, а гранулы осторожно ресуспендировали в 5 мл раствора MMG (рис. 28 b).

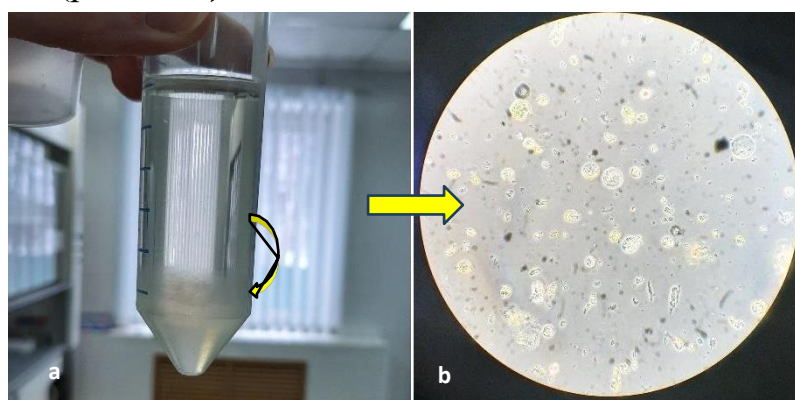


Рисунок – 21 а) Промежуточная мутная фаза, содержащая живые протопласты; б) Изолированные протопласты по протоколу Poddar et al., (2020)

Из таблицы 3 видно, что все три протокола дают низкие результаты по плотности протопластов, что принято считать недостаточными для процессов слияния или регенерации, поскольку приемлемая плотность составляет не менее 10^5 протопластов на миллилитр.

Таблица – 3 Плотность выделенных протопластов из клеточной суспензии в соответствии с различными протоколами, средняя плотность протопластов (протопластов на миллилитр), процент успешности изоляции в зависимости от процента нормальных здоровых протопластов.

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%

Кроме того, хотя метод, описанный Grzebelus et al., (2012), позволил получить наибольшее число изолированных протопластов, процент жизнеспособных протопластов был ниже по сравнению с первым протоколом.

Были предприняты многочисленные усилия по выделению протопластов с использованием

ранее установленных протоколов. Основываясь на результатах выделения и предстоящего сравнительного анализа, в рамках данного исследования был разработан новый протокол выделения для достижения наиболее эффективных и перспективных результатов. Новый протокол был направлен на дальнейшую оптимизацию процесса выделения протопластов и получение максимально возможного качества и количества протопластов для их последующего изучения и практического применения.

3.4.2 Разработка протокола для изоляции протопластов мезофилла из проростков моркови

Оценивались параметры выделения протопластов, включая концентрацию сорбита/маннитола, продолжительность предплазмолиза, время обработки ферментов, концентрацию используемых ферментов, количество и типы промывочных растворов, а также диаметр фильтрации с использованием листьев моркови. Наконец, мы изучили, как эти переменные влияют на жизнеспособность и выход протопластов моркови.

3.4.2.1 Влияние концентрации сорбита при предварительной обработке на выход и жизнеспособность протопластов

В данном исследовании сорбит выступал в качестве единственного осмотического агента. На этапе предварительной обработки выход свободных протопластов значительно варьировал при различных концентрациях сорбита 0,3, 0,5 и 1 М, а 0 М служил контролем, где предварительная обработка не применялась. Выход протопластов значительно увеличивался при повышении концентрации сорбита, достигая максимального значения $3,41 \times 10^5$ протопластов на грамм живого веса при концентрации сорбита 1 М ($P \leq 0,05$) после 4 часов ферментативной обработки (рис. 29). Жизнеспособность протопластов демонстрировала сопоставимую тенденцию, но заметно снижалась, когда концентрация превышала 0,5 М. Жизнеспособность достигала 95 % при концентрации 0,5 М ($P \leq 0,05$) при времени обработки ферментами 6 ч. По мере увеличения концентрации сорбита и продолжительности обработки ферментов активность протопластов снижалась. При концентрации 0,3 М выход и активность протопластов были минимальными. Полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальной концентрацией сорбита для предварительной обработки является 0,5 М, при которой достигается наибольший выход и жизнеспособность протопластов.

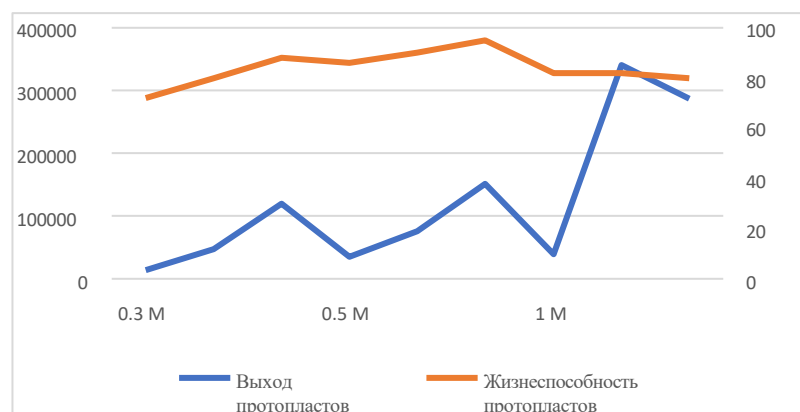


Рисунок – 29 Влияние концентрации сорбита на выход и жизнеспособность протопластов моркови ($P \leq 0,05$), что оценивалось с помощью теста LSD. Приведенные значения представляют собой среднее $\pm$ SD ($n = 3$) стандартное отклонение

Согласно результатам статистического анализа (табл. 4), нет существенной разницы в жизнеспособности протопластов при концентрации сорбита 0,5 М с последующим 4 и 6 ч с обработанным ферментом, или даже при 0,3 М с 6 ч обработанные ферментами (табл. 5).

Таблица – 4 Расчет выхода и жизнеспособности полученных протопластов при использовании различных концентраций сорбита.

Время обработки ферментами, час.	Выход протопластов при концентрации сорбита 0,3 М ед.	Средний ед.	Число жизнеспособных протопластов, ед.	Жизнеспособность, %	Выход протопластов в при концентрации и сорбита 0,5 М ед.	Средний ед.	Число жизнеспособных протопластов, ед.	Жизнеспособность, %	Выход протопластов при концентрации сорбита 1 М ед.	Средний ед.	Число жизнеспособных протопластов, ед.	Жизнеспособность, %
	14700		10121	69%	45700		40234	88%	41600		32961	79%
2 h	10300	13800	7594	74%	31800	35133,33	27985	88%	35300	38666,67	29287	83%
	16400		12265	75%	27900		22598	81%	39100		33174	85%
	48300		39984	83%	69200		60367	87%	351200		288910	82%
4 h	41100	47166,67	31995	78%	78900	76366,67	71233	90%	298300	340600	250412	84%
	52100		41132	79%	81000		74687	92%	372300		293214	79%
	112100		99874	89%	160000		153240	96%	321200		251798	78%
6 h	101300	119700	88614	87%	145900	151000	137671	94%	256700	286733,3	203588	79%
	145700		129470	89%	147100		139540	95%	282300		230394	82%

Таблица – 5 Влияние концентрации предварительной обработки сорбитом и времени обработки ферментами на выход протопластов и их жизнеспособность: по результатам статистического анализа PAST.

Сорбит, концентрация при предварительной обработке	Время обработки ферментами, час.	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 ($P \leq 0.05$).

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.

3.4.2.2 Влияние продолжительности обработки ферментами на выход протопластов

В ходе исследования изучалось влияние продолжительности ферментативной обработки клеточной стенки (энзимолиза) на выход и жизнеспособность протопластов. Выход протопластов и их жизнеспособность оценивали через 2, 4 и 6 часов обработки ферментов. Короткий 2-часовой обработки ферментов привел к выделению лишь небольшого количества протопластов. По мере увеличения времени обработки ферментами выход протопластов постепенно увеличивался. Примечательно, что 4-часовой период обработки ферментами привел к резкому увеличению выхода протопластов ($3,41 \times 10^5$ протопластов/г FW), однако это сопровождалось снижением жизнеспособности до 81% (рис. 30). Ферментативная инкубация в течение 6 часов привела к образованию $1,5 \times 10^5$ протопластов/г FW при плазмолизе 0,5 М маннитолом, что считается хорошим выходом протопластов. Однако 6-часовая обработка ферментом с использованием 1 М маннита привела к высокой концентрации протопластов ($2,9 \times 10^5$ протопластов/г FW), но их

жизнеспособность была низкой (79%) и накоплением фрагментов ферментного раствора, что указывает на то, что значительное количество протопластов было повреждено.

Протопласты с крупной сферической морфологией наблюдались в оптимальных условиях микроскопии. Жизнеспособные протопласты демонстрировали зеленую флуоресценцию при исследовании с помощью флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях на рисунке 15 изображены протопласты, они имеют прочную и хорошо очерченную сферическую морфологию, что свидетельствует о физиологически здоровых и жизнеспособных протопластах. Флуоресцентная микроскопия выявила зеленый флуоресцентный сигнал, что дополнительно подтвердило жизнеспособность и структурную состоятельность протопластов.

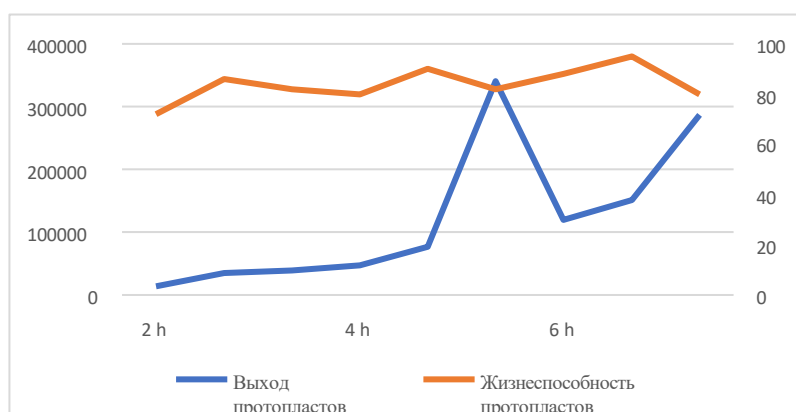


Рисунок – 30 Влияние продолжительности обработки ферментами на выход протопластов и жизнеспособность протопластов моркови. (P,05) согласно тесту LSD. Представленные значения обозначают среднее $\pm$ SD ($n = 3$) стандартное отклонение

Основополагающая работа Кокинга, описывающая методику выделения протопластов растений, была впервые опубликована более шести десятилетий назад (Huang et al., 2013). Протопласты, лишённые клеточных стенок и поэтому чувствительные к осмотическому воздействию, служат универсальной экспериментальной системой для изучения механизмов, лежащих в основе мембранной проницаемости и осморегуляции в растительных клетках (Jia et al., 2016). Высококачественные протопласты часто необходимы для создания эффективных систем экспрессии. Хотя многочисленные исследования

изолированных протопластов были проведены в модельных исследованиях, посвященных протопластам моркови, их изучению уделялось меньше внимания. Для получения высококачественных протопластов моркови с высоким выходом, мы исследовали в данной работе наиболее влиятельные факторы, уделив особое внимание влиянию концентрации сорбитола и продолжительности ферментативного гидролиза.

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.

Протопласты могут быть выделены из различных растительных тканей, включая листья, верхушки побегов, корни, колеоптиль, гипокотиль, черешки, эмбрионы, пыльцевые зерна и каллус. Листья часто являются предпочтительным источником для выделения протопластов из-за их разнообразного происхождения и свободного расположения клеток мезофилла (Aljaramany et al., 2024). Однако наличие жестких клеточных стенок представляет собой серьезную проблему, поскольку для выделения протопластов их необходимо ферментативно разрушить (Peng et al., 2015).

Существующие исследования показывают, что продолжительность культивирования моркови влияет на выход протопластов. Если период культивирования составляет менее 1-2 недель, материал слишком незрелый, чтобы эффективно контролировать время ферментативной обработки, что приводит к образованию значительного количества диссоциированных фрагментов, которые могут осложнить последующие попытки генетической трансформации (Jia et al., 2016). Влияние этого фактора нелегко определить даже при контроле концентрации ферментного раствора. Если продолжительность культуры превышает 5 недель, время ферментативной обработки должно быть увеличено; тем не менее, временные колебания объясняются несоответствиями в зрелости листьев, что может привести к разрыву и распаду недавно выделенных протопластов, что, в свою очередь, может поставить под угрозу последующие эксперименты (Jia et al., 2016).

В результате исследования был сделан вывод, что оптимальный период инкубации составляет от 4 до 5 недель, при этом наиболее эффективным является срок в 5 недель. Для достижения оптимального выхода и качества протопластов в рамках данного исследования был использован листовой материал 5-недельных проростков моркови. Исследователи обнаружили, что 5-недельный период инкубации привел к созданию наиболее прочных и продуктивных культур протопластов, что позволило им получить высокие урожаи этих важных растительных клеток для дальнейшего изучения и экспериментов (Алжарамани и Монахос, 2025).

Осмотический стабилизатор необходим для обеспечения осмотической поддержки протопластов. Тип и концентрация осмотического агента влияют на процесс плазмолиза во время выделения протопластов и помогают сохранить тургорное давление полученных протопластов (Huo et al., 2017). Гиперосмотический стресс приводит к быстрому оттоку воды из клетки, в результате чего протопласт отделяется от клеточной стенки. Поскольку ни один протопласт не может быть отделен без плазмолиза, как в контрольном образце, осмолярность изолирующего раствора оказывала значительное влияние на выход протопластов, и этого можно было достичь, используя сорбит или маннит. Так, перед выделением протопластов листья *Daucus carota* погружали в раствор сорбита на один час. Результаты показали, что стабильность и метаболическая активность протопластов были значительно повышены после предварительной обработки 0,5 М сорбитом.

Другим критическим аспектом, влияющим на выделение протопластов, является временная протяженность обработки ферментов. Длительное воздействие ферментного раствора может нарушить плазматическую мембрану протопласта, нарушить его структурную целостность и энергетические уровни, что может привести к разрыву клетки. И наоборот, недостаточная продолжительность ферментативной обработки будет препятствовать достижению оптимального результата разделения протопласта (Firoozabady, 1986).

Увеличение продолжительности ферментативного гидролиза вызывало разрыв плазматической мембраны, что приводило к снижению выхода протопластов и их жизнеспособности, когда время обработки ферментами превышало 6 часов. По мере продолжения процесса обработки ферментами количество клеточных остатков увеличивалось, а общая жизнеспособность уменьшалась. Таким образом, оптимальное время обработки ферментами составляет 6 часов.

Текущее исследование охватывает только основные элементы, влияющие на разделение протопластов. Условия для обработки ферментами, такие как pH среды для обработанных ферментами, чистота используемых ферментов, температура и параметры роста растительного материала, требуют дальнейшего рассмотрения. Для оптимизации выделения протопластов необходимы более полные исследования.

3.4.3 Разработанный протокол выделения протопластов мезофилла

Асептический материал получают из семян, стерилизованных по трехступенчатой процедуре. Сначала семена инкубируют на водяной бане при

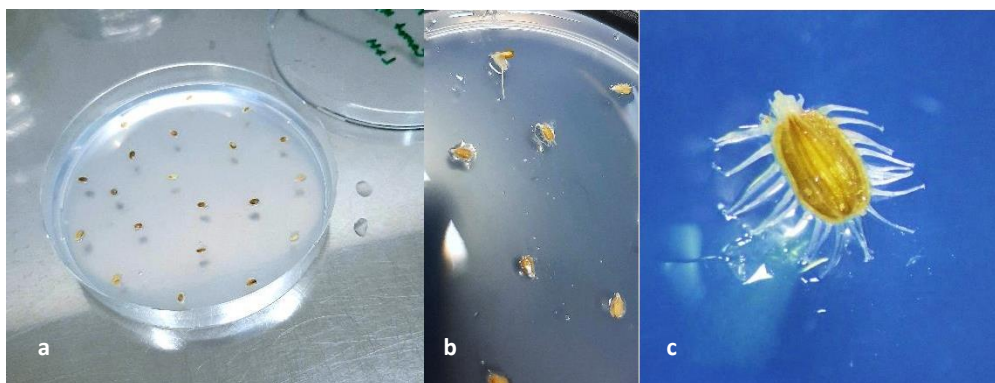


Рисунок – 31 а) Семена моркови, посеянные на питательную среду; б) Прорастание семян морков; в) Микроскопическое изображение одного семени моркови через 3 дня культивирования

температуре 50°C, затем стерилизуют поверхность путем погружения в 95% этанол на 5 минут и 20 минут в 5% NaOCl, содержащий 2 капли Tween 20. Далее 3 раза ополаскивают стерильной дистиллированной водой. Семена высевают на круглые чашки Петри диаметром 9 см, содержащие твердую среду по Мурашиге

и Скоуг (MS) с витаминами, дополненную 30 г/л сахарозы и 6,5 г/л растительного агара, и выдерживают при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте, около 20 семян на чашку помещают на среду для проращивания (рис. 31).

Примерно через 10 дней развития культуры (рис. 32 б) проростки переносят на регенерационную среду, состоящую из макро- и микроэлементов MS, 0,1 мг/л тиамина HCl, 0,1 мг/л пиридоксина HCl, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 3,0 мг/л глицина, 100 мг/л мио-инозитола, 20 г/л сахарозы и 2,5 г/л фитагеля по методике Grzebelus et al., (2011), культуры содержатся в климатической комнате при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Протопласты выделяют из листьев с черешками выращенных *in vitro* проростков моркови (рис. 32 с).

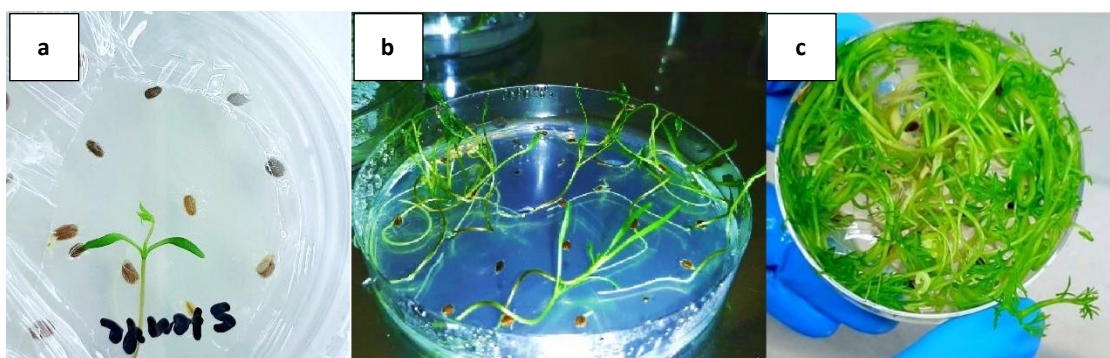


Рисунок – 32 а) одно семя моркови через 5 дней; б) проростки моркови до трансформации; с) 5-недельные проростки моркови

Около 1 г ткани, нарезанной мелкими кусочками, помещают в чашку Петри с 8 мл раствора для протоплазмализации в качестве фазы предварительной обработки (0,5 М сорбитол + 0,05 М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и инкубируют в течение 1 ч в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Плазмелиз - нормальная реакция растительной клетки на гиперосмотический стресс. Потеря тургора приводит к тому, что живой протопласт насильственно отделяется от клеточной стенки (рис. 33). За

плазмолиз в первую очередь отвечает вакуоль. Плазмолиз является обратимым (деплазмолиз) и происходит в живых растительных клетках.

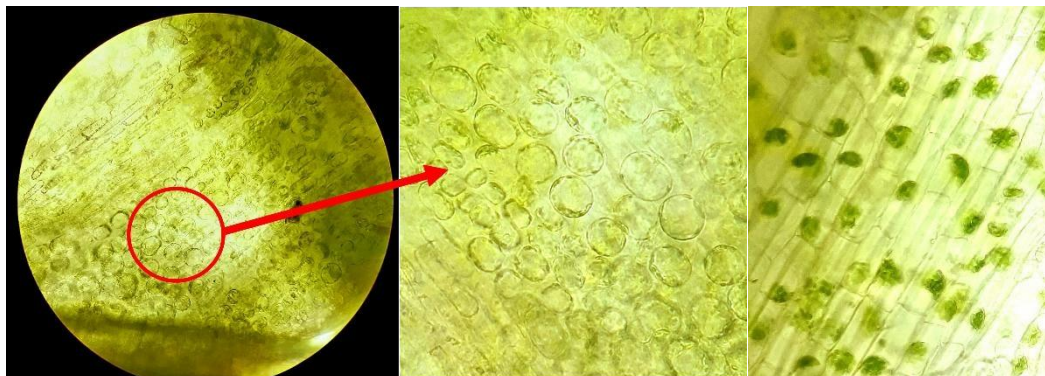


Рисунок – 33 Растительные ткани после плазмолиза демонстрируют сокращение внутриклеточной плазмы в результате потери воды (масштабная линейка =50, с объективом 40×)

Сорбит и маннит выступают в качестве осмотического стабилизатора, который необходим для обеспечения осмотической поддержки протопластов.

Ткани обрабатывают ферментами в течение 6 ч при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (30 об/мин) в ферментной смеси, состоящей из 0,5% (w/v) целлюлазы, 0,1% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N Morpholino) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 М маннитола, pH 5,6, стерилизованной на фильтрах (0,22 мкм, Millipore).

В чашку Петри добавляют 7 мл раствора W5 и осторожно встряхивают вручную в течение 1 мин, чтобы освободить протопласты, после чего фильтруют смесь через 100 и 40 мкм нейлоновой фильтр соответственно, оставшиеся кусочки листьев в чашке смешивали и выдавливали на стенки чашки Петри с 3 мл W5 для получения большего количества протопластов и фильтровали, чтобы получить весь раствор.

Раствор центрифугировали при 150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре в роторе с качающимся ковшом, надосадочную жидкость сливали, протопласты в грануле ресуспендировали в 3 мл 0,5 М маннитол дважды, затем собранные протопласты, оставшиеся в грануле, суспендировали в 2 мл MMG (содержащего 4 мМ MES-буфер pH 5,7, 0,6 М маннитол и 15 мМ MgCl_2).

В оптимальных условиях микроскопии наблюдали протопласты с крупной сферической морфологией (рис. 34 а, b). Жизнеспособные протопласты демонстрировали зеленую флуоресценцию при исследовании с помощью флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях, представленных на рисунке 15, протопласты имеют прочную и хорошо очерченную сферическую морфологию, что свидетельствует о физиологически здоровых и жизнеспособных протопластах. Флуоресцентная микроскопия выявила зеленый флуоресцентный сигнал, что дополнительно подтвердило жизнеспособность и структурную состоятельность протопластов (рис. 34 с).

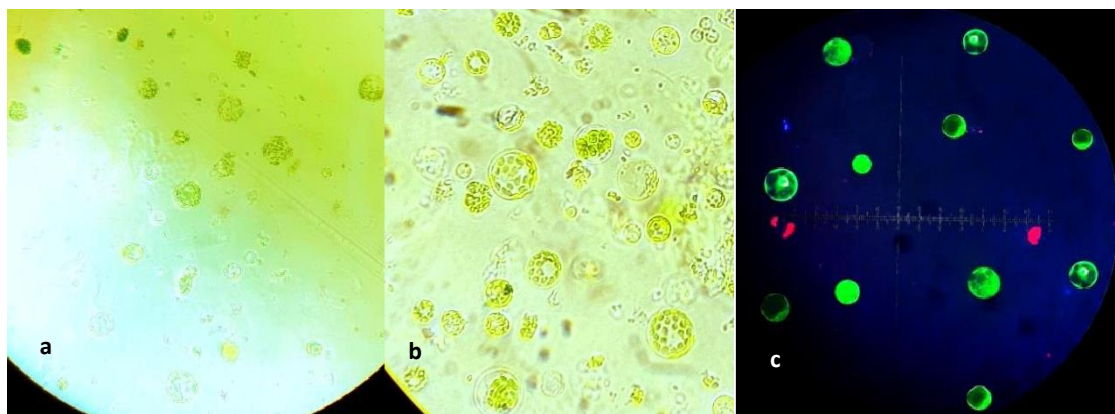


Рисунок – 34 Изолированные протопласты моркови: а) использование 0,5 М сорбита при времени обработки ферментов 4 ч; б) 0,5 М сорбита при 6 ч; в) зеленая флуоресценция жизнеспособных протопластов после окрашивания FDA

3.4.4 Разработанный протокол изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля

Асептический материал был получен из семян фенхеля ($2n = 2x = 22$), стерилизованных по той же процедуре, что и семена моркови, и высеян на 9 см круглые чашки Петри, содержащие твердую среду по MS с витаминами (Murashige and Skoog, 1962), дополненную 20 г/л сахарозы, 25 мг/л NaFeEDTA, 2 мг/л глицина и 6 г/л агара для культуры растительных тканей (рис. 35 а, б). Перед автоклавированием pH всех культуральных сред был отрегулирован до 5,8. Пластины инкубировали при 24 ± 1 °C, чтобы вызвать прорастание семян.

Пятнадцатидневные проростки (рис. 35 с) были перенесены в контейнеры с той же твердой средой.



Рисунок – 35 а) Семена фенхеля, посеянные на культуральную среду; б) семена фенхеля после 5 дней культивирования; с) проростки фенхеля, готовые к индукции каллуса

3.4.4.1 Индукция каллуса

Экспланты листьев и черешков культивировали на среде MS, дополненной 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,5 мг/л 2,4-D (2,4- дихлорфеноксиуксусная кислота), 0,5 мг/л кинетина и 7 г/л агара (рис. 36 а) в соответствии с Bruznican et al. (2018). Культуры поддерживали при 24 ± 1 °C в темноте, и рыхлые каллусы начали появляться через 12 дней, данные видимые каллусы были отобраны (рис. 36 б) и обновлялись ежемесячно (рис. 36 с), пока они не достигли объема, подходящего для инициации клеточной суспензии (рис. 36 d).

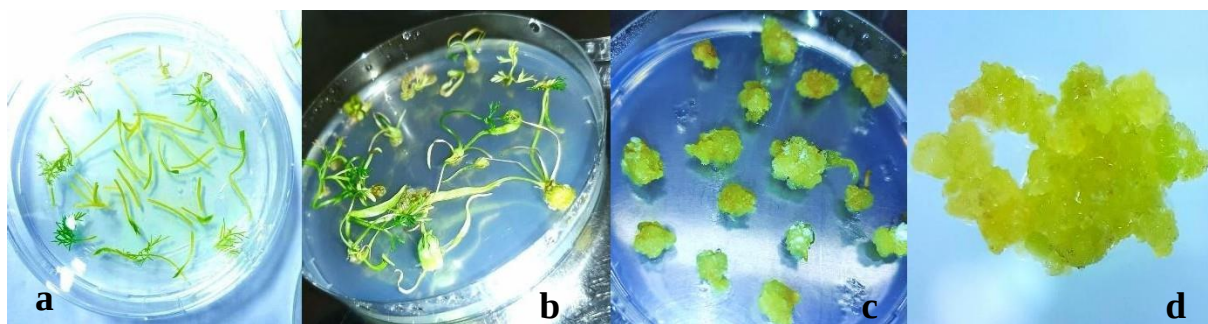


Рисунок – 22 а) Экспланты листьев и черешков, выращенные на среде MS; б) начало появления рыхлого каллуса; с) обновленный каллус; д) готовый каллус для инициирования суспензии клеток под микроскопом

3.4.4.2 Инициация суспензии клеток

Суспензионные культуры клеток были получены путем культивирования 250 мг рыхлого каллуса фенхеля в 6 чашках Петри, содержащих 5 мл жидкой суспензионной среды на основе среды MS, дополненной 30 г/л сахарозы, 0,5 г/л ферментативного гидролизата казеина, 0,6 мг/л 2,4-D и 0,55 мг/л кинетина. Культуры инкубировали при 24 ± 1 °C в темноте при постоянном перемешивании (60 об/мин) (Aljaramany and Monakhos, 2024).

Через неделю после инициации (рис. 37 а) каллус был удален из среды путем процеживания через стерильное сито 100 мкм. Культуры обновляли еженедельно, заменяя среду свежей жидкой культуральной средой, поддерживая постоянный объем культуры (рис. 37 б). Когда суспензия стабилизировалась и активно делилась, культуры еженедельно субкультивировали, разбавляя их 1:1 свежей жидкой культуральной средой.

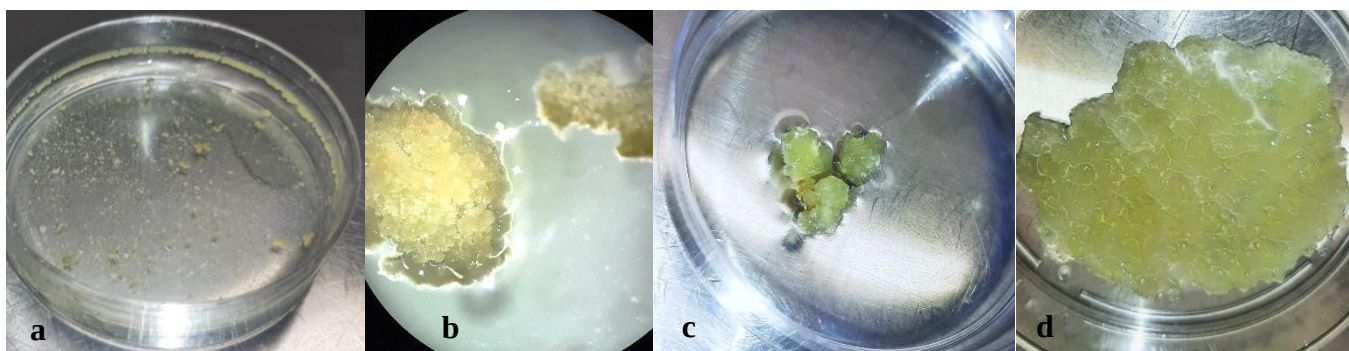


Рисунок – 23 а) Каллус через неделю после инициации; б) культуры достигли постоянного объема; с) 5- 9-недельные суспензионные культуры стабилизированы и готовы к изоляции протопластов; d) суспензия клеток разрезана на мелкие кусочки

3.4.4.3 Выделение и очистка протопластов

После индукции каллуса и инициирования клеточной суспензии протопласты выделяли из суспензионных культур в возрасте от 5 до 9 недель на 4-й день после субкультивирования (рис. 37 с) по протоколу Grzebelus et al. (2012) с некоторыми изменениями.

Около 1 г свежего веса суспензионных клеток разрезали на мелкие кусочки (рис. 37 d) и инкубировали в 10 мл ферментного раствора, содержащего 0,5% (w/v) целлюлазы, 0,05% (w/v) пектиназы, 20 мМ 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 5 мМ CaCl₂ и 0,6 М маннитола и стерилизовали на фильтре (0,2). Обработку ферментами проводили в течение ночи при 24±1 °С при осторожном встряхивании (30 об/мин) в темноте.

После обработки ферментами протопласты фильтровали через нейлоновые сита 100 мкм и 40 мкм и центрифугировали при 150 g в течение 10 минут по методике Aljaramany et al., (2024).

Жизнеспособные протопласты в полученной грануле промывали 7 мл среды W5 (Menczel et al., 1981), затем дважды по 5 мл 0,6 М маннитол и центрифугировали после каждого промывания при 150 g в течение 8 минут.

После ферментативной обработки отделение протопластов от непереваренной ткани, остатков клеточной стенки и мертвых клеток может стать важнейшим этапом культивирования протопластов. Остатки и мертвые клетки могут оказывать пагубное влияние на живые протопласты, потенциально препятствуя их делению и развитию. Для решения этой проблемы обычно используются такие методы, как фильтрация, сахарозные подушки или градиентное центрифугирование по плотности.

3.4.4.4 Культивирование и регенерация протопластов

Каллус, полученный из черешков и листовых пластинок, культивировали в жидкой среде. Примерно через четыре недели культуры клеток достигли стационарной фазы роста, при этом клетки начали делиться в течение первой недели. Затем раз в неделю проводили субкультивирование. Характерно, что сформировались скопления клеток размером 2-3 мм. После четырех циклов субкультивирования клеточная суспензия стабилизировалась и стала пригодной для выделения протопластов. Были получены протопласты высокого качества и в большом количестве - 10⁶, здоровые, сферической формы (рис. 38 а).

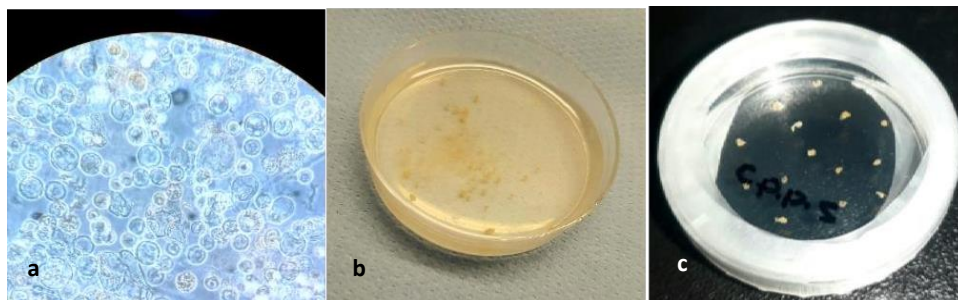


Рисунок – 24 а) выделенные протопласты; б) микрокалусы, полученные при культивировании протопластов; с) Микрокалусы, перенесенные на твердую среду

Основываясь на предыдущих исследованиях, мы были уверены в эффективности методов выделения и культивирования протопластов для получения более крупных регенерированных проростков.

Из протопластов, полученных из фенхеля, образуются микрокалусы (рис. 38 б) и, наконец, каллус (рис. 38 с). Однако регенерированные побеги полностью развиваются в растения при культивировании на среде, не содержащей гормонов.

Регенерация протопластов — это многоступенчатый процесс, зависящий от различных факторов, таких как исходный материал и система культивирования, метод, используемый для выделения протопластов, их плотность, состав среды, условия культивирования и подход к пополнению среды (Reed and Bargmann, 2021). Выделение протопластов - ключевой метод в исследованиях растений, при котором происходит ферментативное или механическое удаление клеточных стенок из растительных клеток, в результате чего получают клетки без стенок, которые могут быть использованы в различных областях генетики растений, биотехнологии и клеточной биологии. Создание надежного протокола для эффективной регенерации протопластов требует изучения различных условий на каждом этапе (Chu-reau et al., 1993).

Данное исследование посвящено регенерации растений коммерческого гибрида фенхеля "Дракон" и описывает методику выделения протопластов, культивирования и регенерации растений фенхеля, начиная с культур клеточных суспензий. Данный подход, а именно выделение протопластов из суспензии

клеток, затем культивирование в богатой питательными веществами среде, позволяет прийти к образованию клеточных стенок, делению клеток и, в конечном итоге, к регенерации целых проростков (Aljaramany and Monakhos, 2025).

Исходный материал, используемый для выделения протопластов, является решающим фактором для успешной регенерации протопластов в растения. Суспензии клеток часто используются для выделения протопластов, которые демонстрируют высокую способность к регенерации. Предыдущие значимые исследования показали, что суспензионные культуры клеток более пригодны для регенерации протопластов по сравнению с альтернативными типами тканей благодаря своим уникальным характеристикам, таким как способность к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток.

В протоколах регенерации протопластов обычно используются цитокинины тидиазурон и зеатин. Было показано, что зеатин способствует эффективной регенерации протопластов в культурах моркови (Dirks et al., 1996; Grzebelus et al., 2012), *Solanum* (Borgato et al., 2007), *Allium* (Hansen et al., 1995) и *Stevia* (Lopez-Arellano et al., 2015). TDZ демонстрирует мощную способность к регенерации побегов, что особенно заметно в протопластах древесных видов растений, включая *Populus* (Chupeau et al., 1993). TDZ также эффективно индуцирует побеги из каллуса. Хотя культура протопластов у некоторых видов специфична для цитокининов, мы наблюдали, что и TDZ, и зеатин индуцировали деление протопластов и образование каллуса. Мы пришли к выводу, что тип цитокинина не является критическим для регенерационной компетентности фенхеля. Это TDZ делает ценным инструментом для биотехнологии растений, поскольку он позволяет эффективно стимулировать регенерацию побегов из протопластов растений, которые затем могут быть использованы в различных сферах применения, таких как генетическая трансформация и производство клоновых саженцев.

Для создания гибридных растений были проведены многочисленные эксперименты с использованием двух основных методов: соматической

гибридизации с помощью электро- или хемосмещения и половой гибридизации с использованием ручного скрещивания моркови с родственными видами в сочетании с процедурой спасения зародыша.

3.4.5 Слияние протопластов моркови с родственными видами

Все эксперименты по слиянию проводили с использованием линии моркови в качестве акцептора и фенхеля с ЦМС в качестве донора. Протопласты акцептора и донора суспендировали в 0,5 М маннитоле при плотности 10^5 протопластов на мл. Из акцепторных и донорных протопластов составляли смеси 1:1: морковь и фенхель.

3.4.5.1 Хемослияние протопластов суспензии клеток *Foeniculum vulgare* с протопластами мезофилла *Daucus carota*

Очищенные протопласты из клеток каллуса (рис. 39 а) и протопласты мезофилла (рис. 39 б) смешивали в соотношении 1 : 1 в предфузионном растворе.

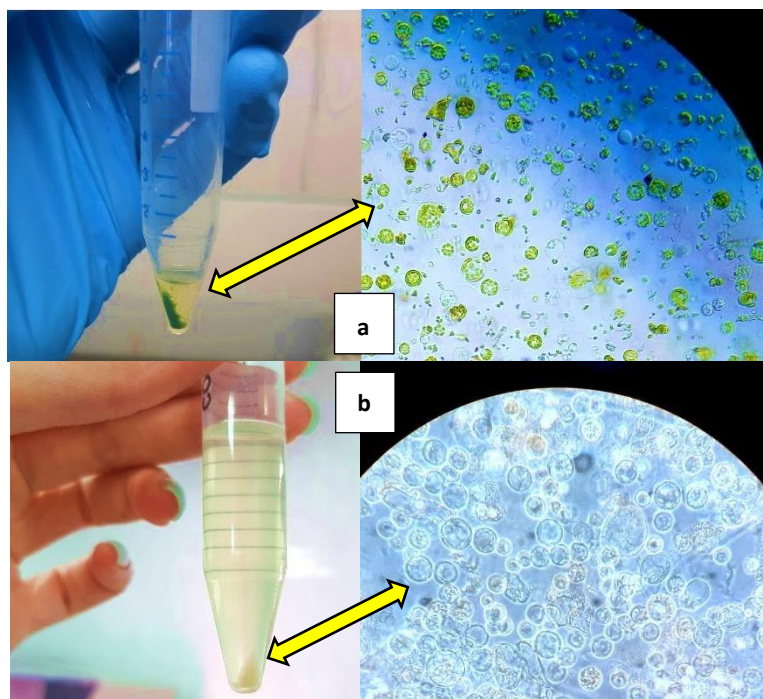


Рисунок – 39 а) Протопласты из клеток мезофилла; б) Протопласты из клеток каллуса

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) (рис. 40), а некоторые слитые протопласты представляли собой слияние нескольких родительских протопластов.

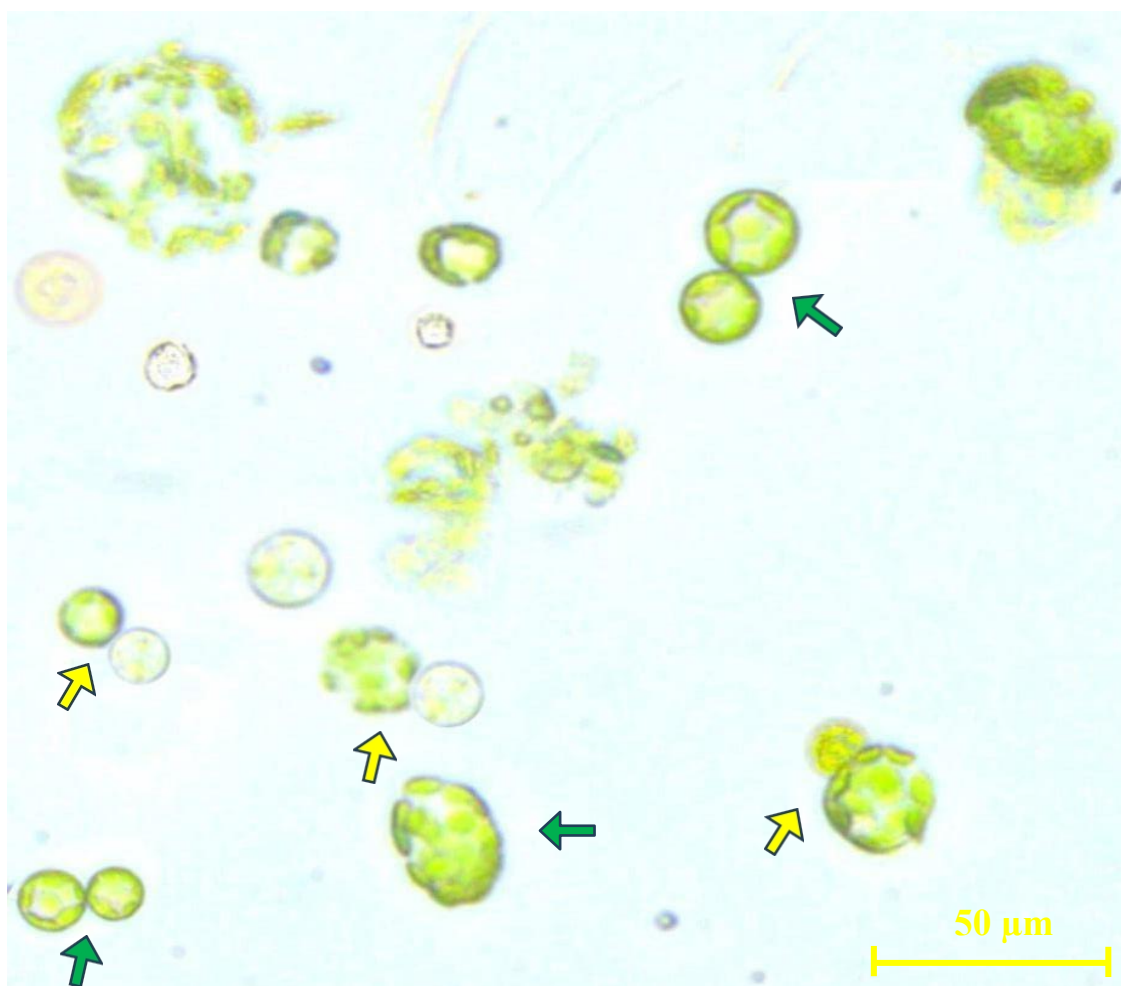


Рисунок – 40 Сближение в питательной среде протопластов: протопласты мезофилла и каллуса (желтые стрелки), сближение протопластов клеток мезофилла и мезофилла (зеленые стрелки)

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. 41).

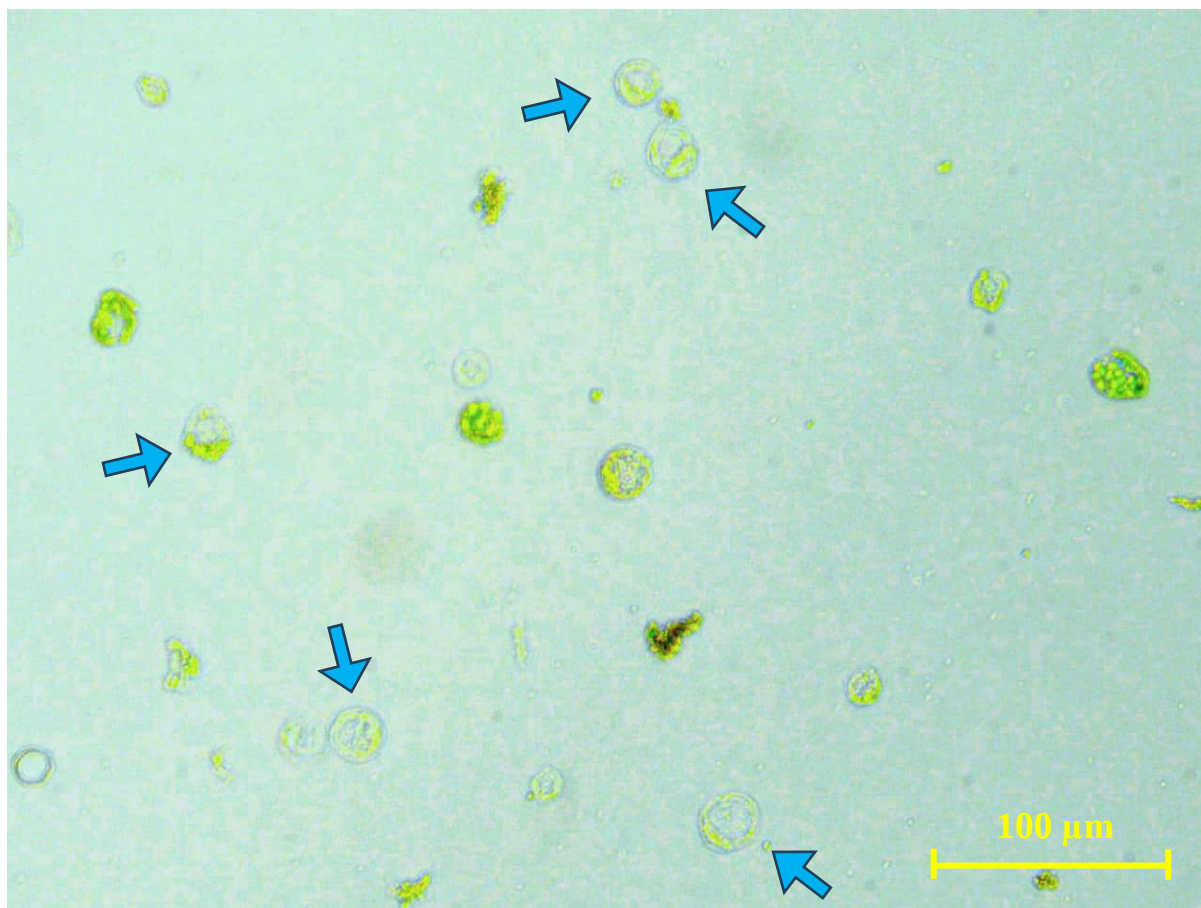


Рисунок – 41 Клетки соматических гибридов через 2 дня культуры, синие стрелки указывают на слившиеся протопласты с зеленым и светло-прозрачным цветами

Как показано на рис. 40, некоторые слившиеся протопласты произошли из двух протопластов мезофилла, которые можно легко идентифицировать по их концентрированной зеленой окраске.

Через 5 дней культивирования различные клеточные компоненты, которые выглядели зелеными и полупрозрачными в цитоплазме слитых протопластов, стали диффузными, как показано на (рис. 42). Это затрудняло четкую дифференциацию слитых протопластов от других клеток, и некоторые из них разрывались.



Рисунок – 42 Клетки соматических гибридов после 5 дней культивирования

Затем, еще через 15 дней, большинство клеток увеличилось (рис. 43).

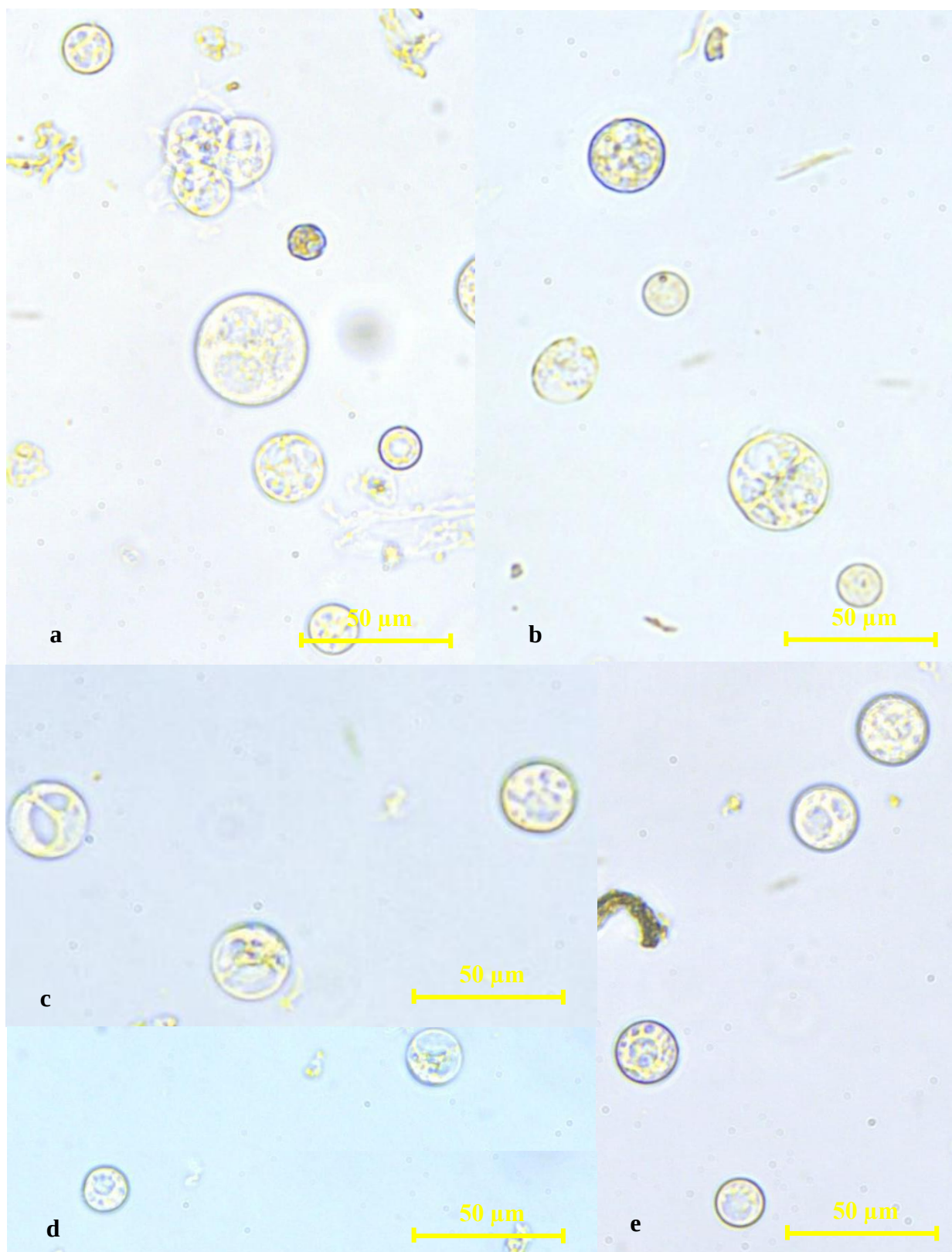


Рисунок –43 Клетки соматических гибридов после 20 дней культивирования

Количество слившихся клеток и гибридных слившихся клеток от общего культивируемых протопластов было тщательно подсчитано (табл. 6), подсчет общего количества клеток проводился с помощью камеры Фукс-Розенталя.

Таблица – 6 Количественная характеристика этапов слияния протопластов из каллусной ткани фенхеля (*F. vulgare*) и протопластов из мезофилла листьев моркови (*D. carota* L).

Общее число изолированных и культивируемых протопластов фенхеля и моркови, шт.	200000	2×10^5
Общее число клеток, образовавшихся в результате слияния протопластов, шт.	68013	$6,8 \times 10^4$
Число гибридных слияний протопластов моркови и фенхеля, шт.	46091	$4,6 \times 10^4$

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 дней, после чего они начали приобретать коричневатый оттенок, свидетельствующий о их гибели.

3.4.5.2 Слияние под действием электрического тока

Электрическое слияние с помощью устройства Gene Pulsur Xcell основано на точно контролируемых электрических импульсах для кратковременной проницаемости клеточных мембран, что позволяет вводить экзогенные молекулы или генетический материал. Однако в нашем эксперименте процесс слияния оказался безуспешным из-за критического ограничения устройства - минимальное напряжение устройства составляет 10 В, в то время как для этапа выравнивания требовалось напряжение 2-5 В (Bhowmik et al., 2018). В результате

протопласты, подвергшиеся электрофузии без надлежащей калибровки, разрывались под действием высокого напряжения.

Попытки применить электрическое слияние пропустив этап калибровки, приводили к беспорядочному разрыву клеток под действием тока высокого напряжения (рис. 44).

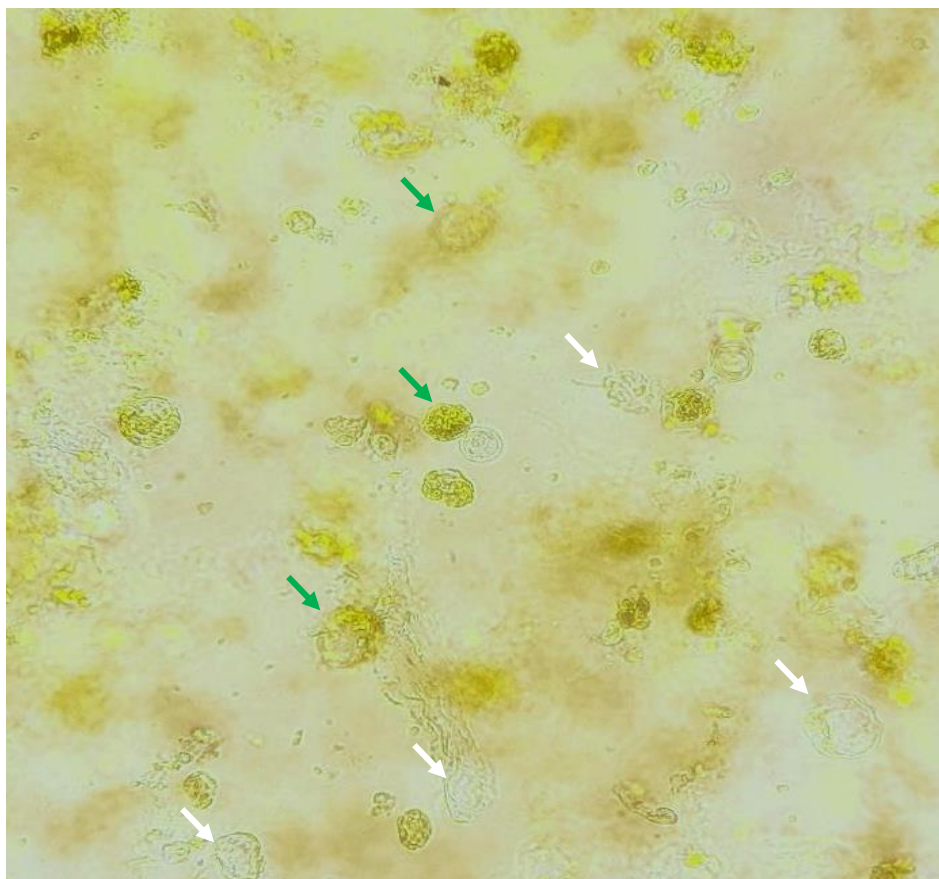


Рисунок 44 - Разрыв клеток фенхеля (белые стрелки) и моркови (зеленые стрелки) под действием тока высокого напряжения (10 В)

Принцип электрическое слияние основан на использовании электрического поля для вызывания слияния клеток, и этот процесс включает несколько ключевых этапов, которые необходимо тщательно контролировать для достижения успешного слияния и минимизации повреждения клеток. Калибровка клеток играет ключевую роль в этом процессе, поскольку она обеспечивает близкое взаиморасположение и контакт между клетками, подлежащими слиянию. Точная калибровка способствует образованию мостиков

слияния - локализованных областей слияния мембран, которые в конечном итоге приводят к образованию гибридной клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. 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 проявляют мужскую стерильность.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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 часов экспозиция.
6. 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.
7. Использование выявленных закономерностей в модифицированном протоколе позволило повысить выход жизнеспособных протопластов в экстрагированном виде до $1,51 \times 10^5$ протопластов на миллилитр с жизнеспособностью 95%, что в 13-раза превышает число протопластов, изолируемых по стандартному протоколу в нашем эксперименте, и соответствует требованиям успешного слияния или регенерации протопластов (плотность в диапазоне 5×10^4 - 1×10^6 протопластов на миллилитр).
8. В результате исследования впервые представлен успешный метод выделения протопластов из клеточной суспензии фенхеля (*F. vulgare*) с плотностью, достигающей 1×10^6 протопластов на миллилитр.
9. 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 рекомендовано использовать в качестве источников признака стерильности 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 сокращений

М – моль

г. – год

г/л – грамм на литр

ЛКП – Локусы количественных признаков

мин. – минута

мкл – микролитры

мл – миллилитры

мм – миллиметры

мОсм – миллиосмоль единица измерения осмотической концентрации

МТ-ДНК – Митохондриальная ДНК

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ПЭГ – Полиэтиленгликоль

см – сантиметры

ЦМС – цитоплазматической мужской стерильности

ч. – часы

ЯМС – Ядерная мужская стерильность

CPP – Carrot Petiole Protoplast

CPW – Cell and Protoplast Washing solution

FDA – Fluorescein Diacetate

MAS – Marker-Assisted Selection

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

OP – Open pollinated, свободно опыляемые культуры

ORF – Open Reading Frame, открытые рамки считывания

W/V – weight/volume, вес по объему

Библиографический список

1. Алжарамани, Н. Оптимальные параметры для изоляции протопластов мезофилла моркови *in vitro* / Н. Алжарамани, С. Г. Монахос // Овощи России. – 2025. – № 3. – С. 5–9. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2025-3-5-9>
2. Алжарамани, Н. Оптимизация технологии выделения протопластов с использованием листьев *Daucus Carota* (моркови) *in vitro* / Н. Алжарамани, С. Г. Монахос // ФГБНУ ВНИИСБ. – 2023. – С. 72–74.
3. Чистова, А. В. Применение метода молекулярно-генетического анализа для выявления растений моркови с цитоплазмой типа «петалоид» / А. В. Чистова // 2018. – С. 33–35. <http://dx.doi.org/10.25630/PAV.2018.9.18333>
4. Adedeji, O. S. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* cv. White ND / O. S. Adedeji, A. H. Naing, C. K. Kim // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2020. – № 141. – P. 571–581. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01816-3>
5. Aljaramany, N. Isolation and regeneration of cell suspension-derived *Foeniculum vulgare* protoplasts / N. Aljaramany, S.G. Monakhos // *BIO Web of Conferences.* – 2024. – № 58. – P. 05008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202413905008>
6. Aljaramany, N. Somatic hybridization in agricultural crops improvement: An environmentally amiable era in biotechnology / N. Aljaramany, A. V. Vishnyakova, S. G. Monakhos // *Caspian J. Environ. Sci.* – 2024. – № 22(5). – P. 1233–1241. <https://doi.org/10.22124/cjes.2024.8236>
7. Arimura, S. The mitochondrial genome of an asymmetrically cell-fused rapeseed, *Brassica napus*, containing a radish-derived cytoplasmic male sterility-associated gene / S. Arimura, S. Yanase, N. Tsutsumi, N. Koizuka // *Genes Genet. Syst.* – 2018. – № 93(4). – P. 143–148.
8. Balk, J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflowers is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release / J. Balk, C. J. Leaver // *Plant Cell* – 2001. – № 13(8). – P. 1803–1818.

9. Baranski, R. Genetic engineering of carrot / R. Baranski, A. Lukasiewicz // In: Simon, P. W. et al. (eds.) The carrot genome. Springer, Cham – 2019. – P. 149–186.
10. Baranski, R. Genetic transformation of carrot and other Apiaceae species / R. Baranski // Transgenic Plant J. – 2008. – № 2. – P. 18–38.
11. Baranski, R. Monitoring the expression of green fluorescent protein in carrot / R. Baranski, E. Klocke, U. Ryschka // Acta Physiologiae Plantarum. – 2007. – Vol. 29. – P. 239–246.
12. Bhattacharjee, B. Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice / B. Bhattacharjee, A. Sane, H. Gupta // Mol. Breed. – 2015. – № 5. – P. 319–327. <https://doi.org/10.1023/A:1009662231294>
13. Bhattacharya, J. Cytoplasmic male sterility-based hybrids: mechanistic insights / J. Bhattacharya, R. B. Nitnavare, P. Bhatnagar-Mathur, P. S. Reddy // Planta – 2024. – 260. – Article 100. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-024-04532-w>
14. Bhojwani, S. S. Parasexual hybridization / S. S. Bhojwani, P. K. Dantu // In: Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (eds.) Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India – 2013. – P. 173–198. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_14
15. Bhowmik, P. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9 / P. Bhowmik, E. Ellison, B. Polley et al. // Sci. Rep. – 2018. – 8. – Article 6502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24690-8>
16. Bora, R. Production of Somatic Hybrids and Cybrids / R. Bora // – 2023. – № 3. – P.75-92.
17. Borgato, L. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (Solanaceae) / L. Borgato, F. Pisani, A. Furini // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2007. – 88. – P. 247–252.
18. Broussard, M. A. Possible mechanisms of pollination failure in hybrid carrot seed and implications for industry in a changing climate / M. A. Broussard, F. Mas, B. Howlett, D. Pattemore, J. M. Tylianakis // PLoS One – 2017. – 12(6). – Article e0180215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180215>

19. Bruznican, S. An asymmetric protoplast fusion and screening method for generating celeriac cybrids / S. Bruznican, T. Eeckhaut, J. Huylensbroeck, E. Keyser, H. Clercq, D. Geelen // Sci. Rep. – 2021. – № 11. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83970-y>
20. Bruznican, S. Tissue culture technology for asymmetric protoplast fusion in celery (*Apium graveolens*) and leek (*Allium porrum*) / S. Bruznican // PhD Thesis, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University – 2017.
21. Chapagain, S. A comprehensive review on application and future prospect of cytoplasmic male sterility / S. Chapagain // Acta Scientifica Malaysia – 2024. – № 8(1). – P. 21–27. <http://doi.org/10.26480/asm.01.2024.21.27>
22. Chen, K. Isolation, purification, and application of protoplasts and transient expression systems in plants / K. Chen, J. Chen, X. Pi, L. Huang, N. Li // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – № 24(23). – P. 16892. <https://doi.org/10.3390/ijms242316892>
23. Chen, Z. Plant Mitochondrial Genome Evolution and Cytoplasmic Male Sterility / Z. Chen, N. Zhao, S. Li, C.E. Grover, H. Nie, J.F. Wendel, J. Hua // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2017. – № 36(1). – P. 55–69. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1327762>
24. Cheng, Y. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) plus Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids / Y. Cheng, W. Guo, X. Deng // Plant Cell Rep. – 2003. – № 21. – P. 445–451. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0532-2>
25. Christey, M. Brassica protoplast culture and somatic hybridization / M. Christey // Biotechnol. Agric. For. – 2004. – № 54. – P. 119–148. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06164-0_8
26. Chugh, C. CMS Line in Carrot / C. Chetna, S. Mishra, M. Mangal, S. Singh, P. Kalia // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2020. – № 9(2). – P. 51–65. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.008>
27. Chupeau, M. C. Requirement of thidiazuron for healthy protoplast development to efficient tree regeneration of a hybrid poplar (*Populus tremula* x *P.*

alba) / M. C. Chupeau, M. Lemoine, Y. Chupeau // J. Plant Physiol. – 1993. – 141. – P. 601–609.

28. Condic, M. L. Totipotency: what it is and what it is not / M. L. Condic // Stem Cells Dev. – 2014. – № 23. – P. 796–812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>

29. Corak, K. Comparison of genotypic and phenotypic selection of breeding parents in a carrot (*Daucus carota*) germplasm collection / K. E. Corak, R. K. Genger, P. W. Simon, J. C. Dawson // Crop Sci. – 2023. – № 63. – P. 1998–2011. <https://doi.org/10.1002/csc2.20951>

30. Cui, H. Introgression of bread wheat chromatin into tall wheatgrass via somatic hybridization / H. Cui, Z. Yu, J. Deng, X. Gao, Y. Sun, G. Xia // Planta – 2009. – № 229. – P. 323–330. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0832-z>

31. Davey, M. R. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives / M.R. Davey, P. Anthony, J.B. Power, K.C. Lowe // Biotechnology Advances. – 2005. – № 23(2). – P. 131–171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09>

32. de Almeida, M. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study / M. de Almeida, C. V. de Almeida, E. Mendes Graner, G. Ebling Brondani, M. Fiori de Abreu-Tarazi // Plant Cell Rep. – 2012. – № 31. – P. 1495–1515. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6>

33. de Souza, T. S. P. Cellulases, hemicellulases, and pectinases: applications in the food and beverage industry / T. S. P. de Souza, H. Y. Kawaguti // Food Bioprocess Technol. – 2021. – № 14. – P. 1446–1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>

34. Deroles, S. Factors affecting transformation of cell cultures from three dicotyledonous pigment-producing species using microprojectile bombardment / S. Deroles, M. A. L. Smith, C. Lee // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2002. – № 70. – P. 69–76.

35. Deryckere, D. Low melting point agarose beads as a standard method for plantlet regeneration from protoplasts within the *Cichorium* genus / D. Deryckere, T.

Eeckhaut, J. Van Huylenbroeck, E. Van Bockstaele // Plant Cell Rep. – 2012. – № 31. – P. 2261–2269. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1335-8>

36. Dhall, R.K. Advances in Research on Male Sterility / R.K. Dhall // The Science of Horticulture. – 2011. – P.114-133.

37. Dirks, R. A new protoplast culture system in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation / R. Dirks, V. Sidorov, C. Tulmans // Theor. Appl. Genet. – 1996. – 93(5-6). – P. 809–815. <https://doi.org/10.1007/BF00224080>

38. Dovzhenko, A. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana* / A. Dovzhenko, C. Dal Bosco, J. Meurer, H. U. Koop // Protoplasma – 2003. – № 222. – P. 107–111. <https://doi.org/10.1007/s00709-003-0011-9>

39. Du, J. Optimization of protoplast preparation system from leaves and establishment of a transient transformation system in *Apium graveolens* / J. Du, H. Zhang, W. Li, X. Li, Z. Wang, Y. Zhang, A. S. Xiong, M. Li // Agronomy – 2023. – № 13. – P. 2154. <https://doi.org/10.3390/agronomy13082154>

40. Dudits, D. Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: Regeneration of fertile plants / D. Dudits, E. Maroy, T. Praznovszky, Z. Olah, J. Gyorgyey, R. Cella // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1987. – № 84. – P. 8434–8438.

41. Dufay, M. Modelling the maintenance of male-fertile cytoplasm in a gynodioecious population / M. Dufay, P. Touzet, S. Maurice, J. Cuguen // Heredity – 2007. – № 99(3). – P. 349–356.

42. Dunemann, F. Using CRISPR/Cas9 to produce haploid inducers of carrot through targeted mutations of centromeric histone H3 (CENH3) / F. Dunemann, K. Unkel, T. Sprink // Acta Hortic. – 2019. – № 1264. – P. 211–220. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1264.26>

43. Eeuwens, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms / C.J. Eeuwens // Physiologia Plantarum. – 1976. – № 36. – P. 23–28.

44. FAO (2019) Statistics / FAO. – 2019. – <http://www.fao.org/statistics>
45. Farinati, S. Current insights and advances into plant male sterility: new precision breeding technology based on genome editing applications / S. Farinati, S. Draga, A. Betto, F. Palumbo, A. Vannozzi, M. Lucchin, G. Barcaccia // *Front. Plant Sci.* – 2023. – 14. – Article 1223861. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1223861>
46. Fehér, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? / A. Fehér // *Front. Plant Sci.* – 2019. – № 10. – P. 536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
47. Firoozabady, E. Rapid plant regeneration from *Nicotiana*, mesophyll protoplasts / E. Firoozabady // *Plant Sci.* – 1986. – 46(5). – P. 127–131. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90119-6)
48. Fock, I. Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato / I. Fock, C. Collonnier, J. Luisetti, A. Purwito, V. Souvannavong, F. Vedel // *Plant Physiol. Biochem.* – 2001. – № 39. – P. 899–908. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01307-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01307-9)
49. Gamborg, O. L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // *Exp. Cell Res.* – 1968. – 50. – P. 151–158. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
50. Garcia, L.E. Male sterility and somatic hybridization in plant breeding / L.E. Garcia, A.A. Edera, C.F. Marfil, M.V. Sanchez-Puerta // *Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM)*. – 2019. – № 51(2). – P. 475-482.
51. Geerts, P. Protoplast fusion technology for somatic hybridization in *Phaseolus* / P. Geerts, P. Druart, S. Ochatt, J. Baudoin // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2008. – № 12. – P. 41–46.
52. Grzebelus, E. An improved protocol for plant regeneration from leaf- and hypocotyl-derived protoplasts of carrot / E. Grzebelus, M. Szklarczyk, R. Baranski // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2012. – № 109(1). – P. 101–109.
53. Grzebelus, E. Response of carrot protoplasts and protoplast-derived aggregates to selection using a fungal culture filtrate of *Alternaria radicina* / E.

Grzebelus, M. Kruk, A. Macko-Podgorni, D. Grzebelus // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2013. – № 115. – P. 209–222.

54. Guo, R. Two recessive genes controlling thermophotoperiod-sensitive male sterility in wheat / R. X. Guo, D. F. Sun, Z. B. Tan, D. F. Rong, C. D. Li // Theor. Appl. Genet. – 2006. – № 112(7). – P. 1271–1276. <https://doi.org/10.1007/S00122-006-0228-Z>

55. Guo, W. Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness / W. Guo, D. Prasad, Y. Cheng, P. Serrano, X. Deng, J. Grosser // Plant Cell Rep. – 2004. – № 22. – P. 752–758. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0747-x>

56. Guo, W. W. Somatic cybrid production via protoplast fusion for citrus improvement / W. W. Guo, S. X. Xiao, X. X. Deng // Scientia Hort. – 2013. – № 7. – P. 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.018>

57. Han, L. Ginsenoside Rb1 in asymmetric somatic hybrid calli of *Daucus carota* with *Panax quinquefolius* / L. Han, C. Zhou, J. Shi, D. Zhi, G. Xia // Plant Cell Rep. – 2009. – № 28. – P. 627–638.

58. Hansen, E. E. Regeneration of shoots from cell suspension derived protoplasts of *Allium cepa* / E. E. Hansen, J. F. Hubstenberger, G. C. Phillips // Plant Cell Rep. – 1995. – 15. – P. 8–11.

59. Hanson, M. R. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development / M. R. Hanson, S. Bentolila // Plant Cell. – 2004. – № 16 Suppl. – P. S154–169.

60. Huang, H. An efficient cucumber (*Cucumis sativus*, L.) protoplast isolation and transient expression system / H. Huang, Z. Wang, J. Cheng // Sci. Hort. – 2013. – 150(5). – P. 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.011>

61. Huang, W. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility / W. Huang, C. Yu, J. Hu, L. Wang, Z. Dan, W. Zhou, C. He, Y. Zeng, G. Yao, J. Qi, Z. Zhang, R. Zhu, X. Chen, Y. Zhu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2015. – № 112(48). – P. 14984–14989.

62. Huo, A. Establishment of transient gene expression systems in protoplasts from *Liriodendron* hybrid mesophyll cells / A. Huo, Z. Chen, P. Wang, L. Yang, G. Wang, D. Wang, S. Liao, T. Cheng, J. Chen, J. Shi // PLoS ONE – 2017. – 12(3). – Article e0172475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172475>
63. Iovene, M. Interspecific somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* and their haploidization for potato breeding / M. Iovene, R. Aversano, S. Savarese, I. Caruso, A. Matteo, T. Cardi // Biol. Plant. – 2012. – № 56. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0193-5>
64. Jeong, Y. Y. Optimization of protoplast regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana* / Y. Y. Jeong, H.-Y. Lee, S. W. Kim, Y.-S. Noh, P. J. Seo // Plant Methods – 2021. – № 17. – P. 21. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00720-x>
65. Jhang, T. Efficiency of different marker systems for molecular characterization of subtropical carrot germplasm / T. Jhang, M. Kaur, P. Kalia, T. R. Sharma // J. Agric. Sci. – 2010. – № 148(2). – P. 171–181.
66. Jia, X. Y. Optimization conditions of wheat mesophyll protoplast isolation / X. Y. Jia, X. H. Zhang, J. M. Qu, R. Han // Agric. Sci. – 2016. – 7(12). – P. 850–858. <https://doi.org/10.4236/as.2016.712077>
67. Kalloo, G. Vegetable Breeding Vols. I, II and III / G. Kalloo. New Delhi: Panima Educational Agency – 1988.
68. Kang, H. H. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of *Petunia hybrida* cv. Mirage Rose / H. H. Kang, A. H. Naing, C. K. Kim // Biology – 2020. – № 9. – P. 228. <https://doi.org/10.3390/biology9080228>
69. Kang, L. A novel cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* (inap CMS) with carpelloid stamens via protoplast fusion with Chinese woad / L. Kang, P. Li, A. Wang, X. Ge, Z. Li // Front. Plant Sci. – 2017. – № 8. – P. 529.
70. Kao, K. N. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media / K. N. Kao, M. R. Michayluk // Planta – 1975. – 126(2). – P. 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF00380613>

71. Kaur, N. D. A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. / N. D. Kaur, M. Vyvadilová, M. Klíma, M. Bechyně // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2006. – № 42. – P. 103–110.
72. Kielkowska, A. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot / A. Kielkowska, A. Adamus // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2010. – № 102. – P. 309–319.
73. Kim, B. Identification of a gene responsible for cytoplasmic male-sterility in onions (*Allium cepa* L.) using comparative analysis of mitochondrial genome sequences of two recently diverged cytoplasms / B. Kim, K. Kim, T. J. Yang, S. Kim // *Theor. Appl. Genet.* – 2019. – № 132(2). – P. 313–322.
74. Kiszczak, W. Comparison of methods for obtaining doubled haploids of carrot / W. Kiszczak, U. Kowalska, et al. // *Acta Soc. Bot. Pol.* – 2017. – № 86. – P. 3547.
75. Klimek-Chodacka, M. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells / M. Klimek-Chodacka, T. Oleszkiewicz, et al. // *Plant Cell Rep.* – 2018. – № 37. – P. 575–586.
76. Krumbiegel, G. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. / G. Krumbiegel, O. Schieder // *Planta* – 1979. – № 145. – P. 371–375.
77. Kumar, S. Male sterility: mechanisms and current status on identification, characterization and utilization in vegetables / S. Kumar, M. K. Banerjee, G. Kalloo // *Veg. Sci.* – 2000. – № 27. – P. 1–24.
78. Kushlaf, N. A. Studies on cytoplasmic male sterility mediated heterosis and parental divergence in carrot / N. A. Kushlaf // PhD Thesis, IARI, New Delhi – 2011.
79. Latif, Z. Indigenous production of synthetic seeds in *Daucus carota* / Z. Latif, I. A. Nasir, S. Riazuddin // *Pak. J. Bot.* – 2007. – № 39. – P. 849–855.
80. Le Clerc, V. Genebank biodiversity assessments regarding optimal sample size and seed harvesting technique for the regeneration of carrot accessions / V. Le

Clerc, M. Briard, J. Granger, J. Delettre // Biodivers. Conserv. – 2003. – № 12. – P. 2227–2336.

81. Lemma, D. T. Overview of genetics and breeding of carrot (*Daucus Carota* L.): a review / D. T. Lemma // Glob. Acad. J. Agri. Biosci. – 2024. – 6(1). – P. 21–25.
<https://doi.org/10.36348/gajab.2024.v06i01.004>

82. Leunov, V. I. Directions in the selection and seed production of vegetable root crops / V.I. Leunov // Potatoes and vegetables. – 2017. – № 10. P – 6-9.

83. Li, J. Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot / J. R. Li, F. Y. Zhuang, C. G. Ou et al. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2013. – № 112. – P. 275–287.

84. Liu, B. Differentially Expressed Genes between Carrot Petaloid Cytoplasmic Male Sterile and Maintainer during Floral Development / C. Ou, S. Chen, Q. Cao, Z. Zhao, Z. Miao, X. Kong, F. Zhuang // Sci Rep. – 2019. – № 17384(9).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53717-x>

85. Liu, C. Studies on fertility genes and its genetic characters in D2-type CMS lines of common wheat / C. G. Liu, N. Hou, G. Q. Liu, Y. W. Wu, C. L. Zhang, Y. Zhang // Yi Chuan xue bao = Acta Genetica Sinica – 2002. – № 29(7). – P. 638–645.

86. Liu, J. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement / J. Liu, X. Xu, X. Deng // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2005. – № 82(1). – P. 19–44.

87. Liu, J. Regeneration and analysis of citrus inter specific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization / J. Liu, X. Deng // Springer Link – 2002. – № 125. – P. 13–20. <https://doi.org/10.1023/a:1015748411654>

88. Liu, S. Modern technologies provide new opportunities for somatic hybridization in the breeding of woody plants / S. Liu, X. Li, J. Zhu, Y. Jin, C. Xia, B. Zheng, C. Silvestri, F. Cui // Plants – 2024. – 13(18). – Article 2539.
<https://doi.org/10.3390/plants13182539>

89. Lopez-Arellano, M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Stevia rebaudiana* / M. Lopez-Arellano, S. Dhir, N. Colón

Albino, A. Santiago, T. Morris, S. K. Dhir // Br. Biotechnol. J. – 2015. – 5(1). – P. 1–12.

90. Luo, D. A detrimental mitochondrial nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice / D. Luo, H. Xu, Z. Liu, J. Guo, H. Li, L. Chen, C. Fang, Q. Zhang, M. Bai, N. Yao et al. // Nat. Genet. – 2013. – № 45. – P. 573.

91. Mackowska, K. Early selection of carrot somatic hybrids: a promising tool for species with high regenerative ability / K. Mackowska, K. Wityk, E. Grzebelus // Plant Methods – 2023. – № 19. – P. 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01080-4>

92. Maćkowska, K. Plant regeneration from leaf-derived protoplasts within the *Daucus* genus: effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application / K. Maćkowska, A. Jarosz, E. Grzebelus // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2014. – № 117. – P. 241–252.

93. Marek, S. Mitochondrial *atp9* genes from petaloid male-sterile and male-fertile carrots differ in their status of heteroplasmy, recombination involvement, post-transcriptional processing as well as accumulation of RNA and protein product / S. Marek et al. // Theor. Appl. Genet. – 2014. – № 127. – P. 1689–1701.

94. Menczel, L. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastid / L. Menczel, I. Nagy, Z. R. Kizz, P. Maliga // Theor. Appl. Genet. – 1981. – № 59. – P. 191–195.

95. Meyer, C. M. Efficient production of transgene-free, gene-edited carrot plants via protoplast transformation / C. M. Meyer, I. L. Goldman, E. Grzebelus et al. // Plant Cell Rep. – 2022. – № 41. – P. 947–960. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02830-9>

96. Mezzetti, B. PEG-mediated fusion of *Rubus idaeus* (raspberry) and *R. fruticosus* (blackberry) protoplasts, selection and characterization of callus lines / B. Mezzetti, L. Landi, B. Phan, L. Taruschio // Plant Biosyst. – 2001. – № 135. – P. 63–69. <https://doi.org/10.1080/11263500112331350660>

97. Mishra, S. A Review on Male Sterility-Concepts and Utilization in Vegetable Crops / S. Mishra, V. Kumari // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* – 2018. – № 7(2). – P. 3016–3034. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.367>
98. Mulugeta, A. Evaluation of carrot (*Daucus carota* L.) varieties for growth and yield as affected by NPSB fertilizer rates in Gondar district, Ethiopia / A. Mulugeta, F. Asrat, D. Asres, S. Mebrat // *Front. Plant Sci.* – 2025. – 16. – Article 1505302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1505302>
99. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Plant Physiol.* – 1962. – № 15. – P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
100. Murata, M. M. Novel plastidnuclear genome combinations enhance resistance to citrus canker in cybrid grapefruit / M. M. Murata, A. A. Omar, Z. Mou, C. D. Chase, J. W. Grosser, J. H. Graham // *Front. Plant Sci.* – 2019. – № 9. – Article 1858.
101. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // *Nucleic Acids Res.* – 1980. – № 8(19). – P. 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
102. Nakajima, Y. A novel orfB-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS) / Y. Nakajima, T. Yamamoto, T. Muranaka, K. Oeda // *Plant Mol. Biol.* – 2001. – № 46. – P. 99–107.
103. Nakajima, Y. Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs) / Y. Nakajima, T. Muranaka, K. Oeda // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – № 99. – P. 837–843.
104. Nitsch, J.P., Nitsch, C. Haploid plants from pollen grains / J.P. Nitsch, C. Nitsch // *Science.* – 1969. – № 163(3862). – P. 85–87.
105. Noyszewski, A. K. Accelerated evolution of the mitochondrial genome in an alloplasmic line of durum wheat / A. K. Noyszewski, M. A. Loai, Soltani A, Q. G. Yong, N. Huo, S. Meinhardt, P. M. Kianian, S. F. Kianian // *BMC Genomics.* – 2014. – № 15. (67). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-67>

106. Oshima, M. Origin of the CMS gene locus in rapeseed cybrid mitochondria: active and inactive recombination produces the complex CMS gene region in the mitochondrial genomes of Brassicaceae / M. Oshima, R. Kikuchi, J. Imamura, H. Handa // *Genes Genet. Syst.* – 2010. – № 85(5). – P. 311–318.
107. Patel, D. Somatic hybrid plants of *Nicotiana × sanderae* (+) *N. debneyi* with fungal resistance to *Peronospora tabacina* / D. Patel, B. Power, P. Anthony, F. Badakshi, P. Heslop-Harrison, R. Davey // *Ann. Bot.* – 2011. – № 108. – P. 809–819.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr197>
108. Pati, P. Extra thin alginate film: an efficient technique for protoplast culture / P. Pati, M. Sharma, P. Ahuja // *Protoplasma.* – 2005. – (226) – P. 217–221.
<https://doi.org/10.1007/s00709-005-0096-4>.
109. Pelletier, G. Engineering of cytoplasmic male sterility in vegetables by protoplast fusion / G. Pelletier, M. Férault, D. Lancelin, L. Bouldard, C. Doré, S. Bonhomme, M. Grelon, F. Budar // *Acta Hortic.* – 1995. – 392. – P. 11–18.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.392.1>
110. Peng, X. Q. Advances on the isolation of protoplast in gramineous plant / X. Q. Peng, R. Tang, X. M. Xie // *Chin. Agric. Sci. Bull.* – 2015. – 31(1). – P. 252–257. <https://doi.org/10.11924/j.issn.1000-6850.2014-1921>
111. Peterson C.E. Carrot breeding. In: Bassett MJ (ed) *Breeding vegetable crops*/ C.E. Peterson, P.W. Simon // Westport. –1986. – P. 321–356.
112. Pioli, P. D. Plasma cells, the next generation: beyond antibody secretion / P. D. Pioli // *Front. Immunol.* – 2019. – № 10. – Article 2768.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02768>
113. Poddar, S. Efficient isolation of protoplasts from rice calli with pause points and its application in transient gene expression and genome editing assays / S. Poddar, J. Tanaka, J. Cate, B. Staskawicz, M. Cho // *Plant Methods* – 2020. – № 16. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00692-4>
114. Prohens, J. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae / J. Prohens, F. Nuez // Springer. – 2008. – (2). – P. 327-357.

115. Qiu, L. Loading calcium fluorescent probes into protoplasts to detect calcium in the flesh tissue cells of *Malus domestica* / L. Qiu, Y. Wang, H. Qu // *Hortic. Res.* – 2020. – № 7. – P. 91. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0315-3>
116. Que F. Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family / F. Que, X.L. Hou, G.L. Wang, Z.S. Xu, G.F. Tan, T. Li, Y.H. Wang, A. Khadr, A.S. Xiong // *Horticulture Research.* – 2019. – № 6(1). – P.1-15. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0150-6>
117. Ranaware, A. S. Protoplast technology and somatic hybridisation in the family Apiaceae: advances and prospects / A. S. Ranaware, U. K. S. Shekhawat, P. K. Bhagat // *Plant Cell Rep.* – 2023. – 42. – P. 689–709. <https://doi.org/10.3390/plants12051060>
118. Reed, K.M. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies / K.M. Reed, B.O.R. Bargmann // *Front Genome Ed.* – 2021. – № 734951(3). <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
119. Ren, R. Highly efficient leaf base protoplast isolation and transient expression systems for orchids and other important monocot crops / R. Ren, J. Gao, D. Yin, K. Li, C. Lu, S. Ahmad, Y. Wei, J. Jin, G. Zhu, F. Yang // *Front. Plant Sci.* – 2021. – № 12. – P. 626015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.626015>
120. Riggs, T. J. Breeding of F1 hybrid varieties of vegetables / T. J. Riggs // In: Feistritzer, W. P. & Kelly, A. F. (eds.) *Hybrid production of selected cereal oil and vegetable crops.* Rome: FAO – 1987. – P. 149–173.
121. Robison, M. Petaloid-type cms in carrot is not associated with expression of *atp8* (*orfB*) / M. M. Robison, D. J. Wolyn // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – № 112. – P. 1496. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0253-y>
122. Rose, R. J. Developmental biology of somatic embryogenesis / R. J. Rose, F. R. Mantiri, S. Kurdyukov, S. Chen, X. Wang, K. E. Nolan et al. // In: Pua, E. C., Davey, M. R. (eds.) *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives.* Springer Berlin Heidelberg – 2010. – P. 3–26. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4>

123. Sandhu, A. P. S. Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants / A. P. S. Sandhu, R. V. Abdelnoor, S. A. Mackenzie // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2007. – № 104(6). – P. 1766–1770.
124. Saxena K. B. Male Sterility Systems in Major Field Crops and Their Potential Role in Crop Improvement / K. B. Saxena, A. J. Hingane // Springer. – 2015. – P. 639-655. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_25
125. Saxena, K.B. Genetics of fertility restoration in A4-based diverse maturity hybrids of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) / K.B. Saxena, R. Sultana, R.K. Saxena, R.V. Kumar, J.S. Sandhu, A. Rathore, P.B. Kavikishore, R.K. Varshney // Crop Breeding & Genetic. – 2011. – № 51. – P. 574–578. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.07.0440>
126. Scholze, P. Somatic hybrids of vegetable brassicas as source for new resistances to fungal and virus diseases / P. Scholze, R. Krämer, U. Ryschka, K. Klocke, G. Schumann // Springer – 2010. – № 176. – P. 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0205-0>
127. Selvakumar, R. Revealing gene action of different root pigments in tropical carrot / R. Selvakumar, P. Kalia, R. S. Raje // Agric. Res. – 2022. <https://doi.org/10.1007/s40003-022-00624-9>
128. Shankar, L. P. Asymmetric somatic plant hybridization: status and applications / L. P. Shankar, E. Tom, D. Dieter, V. Erik, J. Johan // Amer. J. Plant Sci. – 2013. – № 4(8). – P. 1–10.
129. Shrestha, S. New insights in pectinase production development and industrial applications / S. Shrestha, M. S. Rahman, W. Qin // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – № 105. – P. 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
130. Simon, P. Evidence for simply inherited dominant resistance to *Meloidogyne javanica* in carrot / P. W. Simon, W. C. Matthews, P. A. Roberts // Theor. Appl. Genet. – 2000. – № 100. – P. 735–742.

131. Simon, P. W. Classical and Molecular Carrot breeding / P. W. Simon // In: Simon, P. W. et al. (eds.) The Carrot Genome, Compendium of Plant Genomes. Springer Nature, Switzerland AG – 2019. – P. 137–147.
132. Simon, P.W. Carrot (*Daucus carota* L.) Breeding / P.W. Simon // Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops. Springer. –2021. – P. 213–238. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66965-2_5
133. Simon, P.W. Carrot / P.W. Simon, R.E. Freeman, J.V. Vieira, L.S. Boiteux, M. Briard, T. Nothnagel, B. Michalik, Y.S. Kwon // – 2008. – P. 327–343.
134. Singh, H. Genetic mechanisms for hybrid breeding in vegetable crops / H. Singh, B. S. Sekhon, P. Kumar, R. K. Dhall, R. Devi, T. S. Dhillon, S. Sharma, A. Khar, R. K. Yadav, B. S. Tomar // Plants – 2023. – № 12(12). – P. 2294. <https://doi.org/10.3390/plants12122294>
135. Singh, S. Male sterility systems in wheat and opportunities for hybrid wheat development / S. P. Singh, R. Srivastava, J. Kumar // Acta Physiol. Plant. – 2015. – № 37. – P. 1–13.
136. Sofiari, E. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava / E. Sofiari, C. Raemakers, J. Bergervoet et al. // Plant Cell Rep. – 1998. – № 18. – P. 159–165. <https://doi.org/10.1007/s002990050550>
137. Soriano, L. Regeneration and characterization of somatic hybrids combining sweet orange and mandarin/mandarin hybrid cultivars for citrus scion improvement / L. Soriano, F. Assis, L. Camargo, M. Cristofani, R. Rocha, C. Andrade // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2012. – № 111. – P. 385–392. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0204-z>
138. Steward, F. C. Growth and organized development at cultured cells I. Growth and division of freely suspended cells / F. C. Steward, M. O. Mapes, J. Smith // Am. J. Bot. – 1958. – № 45. – P. 693–703.
139. Stommel, J. R. Influence of 2-deoxy-D-glucose upon growth and invertase activity of carrot cell suspension cultures / J. R. Stommel, P. W. Simon // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1989. – № 16. – P. 89–102.

140. Sun, R. A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves / R. Sun, E. Zuo, J. Qi, Y. Liu, C. Lin, X. Deng // *Funct. Integr. Genomics* – 2019. – № 20. – P. 133–149. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00701-3>
141. Tan, F. Preliminary study of asymmetric protoplast fusion between celery (*Apium graveolens* L.) and CMS carrot (*Daucus carota* L.) / F. Tan, H. Shen, S. Wang, J. Zhou, S. Guo // *Acta Hort. Sin.* – 2009. – № 36. – P. 1169–1176.
142. Thakur, N. Analysis of mitochondrial genome in *Daucus carota* male sterile cytoplasm and development of marker-assisted systems / N. Thakur et al. // *J. Hered.* – 2020. – 111(2). – P. 143–152. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110813>
143. Thi, N. H. Current insights and advances into plant male sterility: molecular mechanisms and applications / N. H. Thi et al. // *Front. Plant Sci.* – 2023. – 14. – Article 1154782. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1223861>
144. Vales, T. Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression / T. Vales, X. Feng, L. Ge, N. Xu, J. Cairney, G. Pullman, G. Peter // *Plant Cell Rep.* – 2007. – № 26. – P. 133–143. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0221-7>
145. Wen, F. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava / F. Wen, W. Su, H. Zheng, B. Yu, Z. Ma, P. Zhang, W. Guo // *Integr. Agric.* – 2020. – № 19(3). – P. 632–642. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62711-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62711-5)
146. Wen, F. Protoplasts culture isolated from friable embryogenic callus of cassava and plant regeneration / F. Wen, S. Xiao, Y. Nie, Q. Ma, P. Zhang, W. Guo // *Scientia Agricultura Sinica* – 2012. – № 45(19). – P. 4050–4056. <http://dx.doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2012.19.017>
147. Wu, Z. Mitochondrial genome and transcriptome analysis of five alloplasmic male-sterile lines in *Brassica juncea* / Z. Wu, K. Hu, M. Yan, L. Song, J. Wen, C. Ma, J. Shen, T. Fu, B. Yi, J. Tu // *BMC Genomics* – 2019. – № 20. – P. 348–363. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5721-2>

148. Xiang, F. The chromosome content and genotype of two wheat cell lines and of their somatic fusion product with oat / F. Xiang, J. Wang, C. Xu, G. Xia // *Planta* – 2010. – № 231. – P. 1201–1210. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1113-1>
149. Xu, F. Exploiting sterility and fertility variation in cytoplasmic male sterile vegetable crops / F. Xu, X. Yang, N. Zhao, Z. Hu, S. A. Mackenzie, M. Zhang, J. Yang // *Hortic. Res.* – 2022. – 9. – Article uhab039. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab039>
150. Xu, X. Y. Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated *Citrus unshiu* and *C. sinensis*: regeneration and characterization of hybrid shoots / X. Y. Xu, Z. Y. Hu, J. F. Li, J. H. Liu, X. X. Deng // *Plant Cell Rep.* – 2007. – № 26. – P. 1263–1273. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0350-7>
151. Xu, Z. CRISPR/Cas9-mediated multiply targeted mutagenesis in orange and purple carrot plants / Z. S. Xu, K. Feng, A. S. Xiong // *Mol. Biotechnol.* – 2019. – № 61. – P. 191–199.
152. Yadav, O. Genetic Improvement of Pearl Millet in India / O. P. Yadav, K. N. Rai // *Agric. Res.* – 2013. – № 2(4). – P. 275–292. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0089-z>
153. Yamagishi, H. Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops / H. Yamagishi, S. Bhat // *Breed. Sci.* – 2014. – № 64. – P. 38–47. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.38>
154. Yan, C. Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. *japonica* / C. Yan, K. Quian, Q. Yan, X. Zhang, P. Xue, W. Huangfu, F. Wu, Y. Zhao, Y. Xue, J. Huang, G. Xu, P. Wu // *Plant Cell Rep.* – 2004. – № 22. – P. 569–575. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0732-4>
155. Yu, Y. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids / Y. Yu, Y. Wenxuan, H. Li, C. Xingkui, L. Ting, J. Liu // *Plant Cell Rep.* – 2013. – № 32. – P. 1687–1701. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1480-8>

156. Zhang, D. Transcriptome analysis of sugarcane young leaves and protoplasts after enzymatic digestion / D. Zhang, R. Wang, S. Han, Z. Li, J. Xiao, Y. Li, L. Wang, S. Li // Life – 2022. – № 12. – P. 1210. <https://doi.org/10.3390/life12081210>
157. Zhou, Y. Isolation of mesophyll protoplasts from tea (*Camellia sinensis*) and localization analysis of enzymes involved in the biosynthesis of specialized metabolites / Y. Zhou, R. Deng, X. Xu, Z. Yang // Beverage Plant Res. – 2021. – № 1. – P. 2. <https://doi.org/10.48130/BPR-2021-0002>
158. Zubko, O. Rb gene introgression from *Brassica carinata* to *Brassica oleracea* / O. Zubko, S. Monakhos, G. Monakhos // ISHS Acta Hortic. – 2018. – № 1202. – P. 107–112. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1202.16>