

**СВЯЗЬ ПЛОИДНОСТИ С ЧИСЛОМ ХЛОРОПЛАСТОВ В ЗАМЫКАЮЩИХ КЛЕТКАХ УСТЬИЦ У ДИПЛОИДНЫХ И АМФИДИПЛОИДНЫХ ВИДОВ *Brassica***

С.Г. МОНАХОС, М.Л. НГУЕН, А.В. БЕЗБОЖНАЯ, Г.Ф. МОНАХОС

Биотехнологические методы создания чистых линий — удвоенных гаплоидов в культурах пыльников и изолированных микроспор широко применяют в современных генетических исследованиях и селекции капустных культур. Общая особенность этих технологий заключается в том, что получаемые *in vitro* растения обладают разным уровнем ploидности и наряду с удвоенными гаплоидами встречаются гаплоиды, тетраплоиды и миксоплоиды. Определение ploидности по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (ЧХЗКУ) отличается от современных способов ее прямой (подсчет числа хромосом и проточная цитометрия) и косвенной оценки простотой исполнения и низкой стоимостью анализа. У ряда представителей рода *Brassica* установлено ЧХЗКУ, характерное для разных уровней ploидности, при этом для *B. oleracea* показано стабильное проявление этого признака, которое не зависит от условий произрастания, положения листа на растении и разновидности последнего, а для *B. campestris* (синоним *B. rapa*) — еще и от возраста растения. Однако приведенные данные основываются на изучении одного или небольшого числа генотипов, кроме того, в литературе отсутствует описание изменений ЧХЗКУ у представителей вида *B. napus* в ответ на внешние воздействия. В настоящей работе проведен сравнительный анализ ЧХЗКУ для листьев гаплоидных и диплоидных растений капусты пекинской (*B. rapa*), озимого рапса (*B. napus*), гаплоидных, ди- и тетраплоидных растений капусты белокочанной (*B. oleracea*), а также изучено влияние трех факторов на проявление этого признака: температурных условий ( $6 \pm 2$  °C и  $24 \pm 2$  °C), стадии развития (вегетативная — 4-5 настоящих листьев, генеративная — цветение) и генотипа. В исследовании использовали широкий спектр генетического материала: растения-регенеранты, полученные в культуре изолированных микроспор, инбредные линии, коммерческие сорта и гибриды F<sub>1</sub>. Установлено, что число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц не относится к генотипспецифичным признакам у капусты пекинской и рапса, то есть у названных культур растения разных генотипов при одном уровне ploидности имеют одинаковое ЧХЗКУ. У инбредных линий капусты белокочанной выявлена зависимость ЧХЗКУ от скороспелости и показана тенденция к формированию большего ЧХЗКУ у раннеспелых линий (Пл, Сюс и др.) и меньшего — у позднеспелых (АМ2, Са1, Гэс2 и др.). При этом у диплоидных скороспелых инбредных линий ЧХЗКУ оказалось в 1,7 раза больше, чем у позднеспелых, что сопоставимо с различиями между гаплоидными и диплоидными растениями капусты пекинской или рапса. Среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидных растений капусты пекинской (*B. rapa*) составило 4,2-7,8, у диплоидных — 7,9-13,6; у амфигаплоидных растений рапса (*B. napus*) — 7,5-12,4, амфидиплоидных — 14,1-20,3 шт.; у гаплоидных растений капусты белокочанной (*B. oleracea*) — 7,7-9,9, диплоидных — 11,7-17,9 и тетраплоидных — 18,0-26,5 шт. Выявлены высокие коэффициенты корреляции между ploидностью и ЧХЗКУ у растений капусты белокочанной (*B. oleracea*), капусты пекинской (*B. rapa*) и рапса (*B. napus*) (соответственно  $r = 0,94$ ,  $r = 0,90$ ,  $r = 0,94$ ). Показано, что у растений признак ЧХЗКУ не изменяется при переходе от вегетативной к генеративной стадии развития и не подвержен влиянию температурного фактора.

**Ключевые слова:** гаплоид, диплоид, капуста белокочанная, капуста пекинская, замыкающие клетки устьиц, число хлоропластов, ploидность, рапс, тетраплоид, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*.

В настоящее время в генетических исследованиях и селекции капустных культур широко применяют биотехнологические методы создания чистых линий — удвоенных гаплоидов в культурах пыльников и изолированных микроспор (1-3). При использовании таких подходов получаемые *in vitro* растения обладают разным уровнем ploидности, и наряду с удвоенными гаплоидами встречаются гаплоидные, тетраплоидные и миксоплоидные формы (4). Определение ploидности растений-регенерантов относится к обязательным элементам технологии получения удвоенных гаплоидов (5, 6).

Описаны разнообразные методы анализа ploидности растений, раз-

личающиеся по точности, трудоемкости и стоимости: подсчет числа хромосом (микроскопирование цитологических препаратов) (7); количественное определение содержания хроматина в ядрах клеток (проточная цитометрия) (8); анализ комплекса косвенных признаков растений — морфологических особенностей, величины замыкающих клеток устьиц, их числа в расчете на единицу площади листовой поверхности, числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (ЧХЗКУ), величины пыльцевого зерна и числа пор на его экзине, фертильности и завязываемости семян (9).

Подсчет числа хромосом в митотических клетках корневых меристем — кропотливая и трудоемкая работа, так как хромосомы капустных мелкие, а число метафазных пластинок зависит от роста корня. Такой подсчет невозможно выполнить при большом числе анализируемых растений, поэтому он остается лабораторным методом (5). Проточная цитометрия считается одним из наиболее эффективных и точных методов определения уровня ploидности, она удобна, простые приемы подготовки материала позволяют анализировать несколько сотен образцов за один рабочий день, кроме того, при анализе используется минимальное количество ткани листа. Однако существенным ограничением остается очень высокая стоимость прибора и, как следствие, себестоимость одного анализа (10). Фенотипическая идентификация по таким отличительным признакам гаплоидных растений, как мужская стерильность, меньший размер вегетативных органов, узкие листья и другие морфологические особенности, неудобна и продолжительна, так как требует культивирования растений на протяжении нескольких месяцев до достижения стадии цветения (11). Определение ploидности растений по ЧХЗКУ легко в исполнении, дешево и применяется в практической селекции растений долгое время.

У озимого рапса (*B. napus*) на растениях, полученных в культуре пыльников, показано варьирование числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в пределах от 12,0 до 14,0 шт. у гаплоидов и от 19,5 до 20,9 шт. — у дигаплоидов (12). Сообщалось, что у капусты пекинской (*B. campestris* ssp. *pekinensis*) у гаплоидных растений число хлоропластов на одну замыкающую клетку устьица составляет 2-4, у диплоидных — 4-6, у тетраплоидных — 8-10 шт. (5). В другом исследовании показано, что число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьица у капусты пекинской варьирует от 6,1 до 8,6 шт. у гаплоидов, от 10,1 до 12,7 шт. — у диплоидов и от 15,9 до 17,8 шт. — у тетраплоидов (13).

По данным S.J.C. Dias (11), растения *B. oleracea* ssp. в гаплоидном состоянии имеют 6-9 хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, в диплоидном — 10-15 и тетраплоидном — 20-25 шт. В работе S. Yuan с соавт. (14), у растений капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*) и листовой капусты (*B. oleracea* var. *alboglabra*), полученных в культуре изолированных микроспор, в паре замыкающих клеток установлено ЧХЗКУ у гаплоидных растений не более 10 шт. (при среднем для одного растения от 6,96 до 7,67), диплоидных — 11-15 шт. (в среднем от 12,36 до 13,89) и полиплоидных — более 15 шт. (со средним от 16,96 до 17,61 для триплоида и от 22,61 до 24,97 для тетраплоида), при этом точность метода определения ploидности составила 93,93 % и не зависела от условий роста растений, культивирования в теплице и холодном рассаднике (14).

Показано, что среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у *B. oleracea* var. очень схоже для разных участков в пределах листовой пластинки (верхней, средней и нижней), для листьев, имеющих разное положение (3-й, 5-й и 7-й настоящий лист), и для растений одного

уровня плоидности, не принадлежащих к одинаковым разновидностям (14). Также отмечено отсутствие существенных различий по ЧХЗКУ в пределах растения у *B. campestris* ssp. *pekinensis* и между растениями-регенерантами с одинаковой плоидностью и указывается на стабильность проявления этого признака независимо от возраста растения, однако стадии его развития, на которых проводилась оценка, не уточняются (5).

В представляемой работе мы определили число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидных, диплоидных и тетраплоидных растений трех видов капустных культур (*B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*) и оценили влияние температуры, возраста и генотипа растений на проявление этого признака.

**Методика.** Объектами изучения были представители трех видов *Brassica*: капуста пекинская (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) — популяции гаплоидных и диплоидных регенерантов МЕДН, (МЧЕ)ДН, ХМДН, Ха642ДН, МlchДН, Кит1-3ДН, ТПВ36ДН (всего 219 растений), полученных в культуре изолированных микроспор; озимый рапс (*B. napus* var. *napus*) — сорт Северянин (Всероссийский НИИ кормов им. В.Р. Вильямса), сортообразцы Гал1, Лим1 и РС23 (ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева») и популяции гаплоидных и диплоидных регенерантов СевДН, ГалДН, ЛимДН и РС23ДН, полученных на основе вышеперечисленных сортов и сортообразцов в культуре изолированных микроспор; капуста белокочанная (*B. oleracea* var. *capitata*) — популяции гаплоидных, ди- и тетраплоидных регенерантов ФарДН, СюрДН, ЭтДН, ПарДН, НазДН (всего 100 растений), полученных в культуре изолированных микроспор, а также 22 диплоидные инбредные линии капусты белокочанной разного срока созревания из генетической коллекции ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева»: раннеспелые (вегетационный период от всходов до технической спелости 80-100 сут) — Пл, Сюс1, Эт1, Сф, Ш5а, Дпп2, Дт; среднеспелые (вегетационный период 110-140 сут) — Ак3, Мер1, Б25, Юф1, С110; позднеспелые (вегетационный период 150-180 сут) — Фл4, Пр3, В64, Хт5, Пм4, Фу44, Бю1, АМ2, Са1, Гэс2.

Оценку влияния температуры на ЧХЗКУ проводили с использованием диплоидных растений капусты пекинской (*B. rapa*, гибриды F<sub>1</sub> Гидра, Нежность); капусты белокочанной (*B. oleracea*, гибриды F<sub>1</sub> СБ-3, Валентина) (оригинатор — ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева»); и амфидиплоидных растений озимого рапса (*B. napus*, сорт Северянин). По три растения каждого образца выращивали в теплице при температуре 24±2 °С и в климатической камере при 6±2 °С с соблюдением стандартной методики ухода. ЧХЗКУ подсчитывали через 75 сут культивирования.

Для изучения изменчивости ЧХЗКУ в зависимости от возраста (стадии развития) растения использовали инбредные линии капусты пекинской Ха642 и капусты белокочанной Бю1б (ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева»), и сорт озимого рапса Северянин. Учитывали число хлоропластов ЗКУ в настоящих листьях 20-суточных семян (стадия 4-5 настоящих листа) и в листьях цветonoсного побега после яровизации в течение времени, необходимого для соответствующей культуры (стадия цветения).

Растения-регенеранты, полученные в культуре изолированных микроспор, после адаптации и растения из семян выращивали в контролируемых условиях теплицы при температуре 24-26 °С/20-22 °С (день/ночь) в весенний и летний периоды по общепринятой методике. Посев семян осуществляли в 64-ячейные кассеты со стороной ячейки 5 см с последующей перевалкой рассады в возрасте 25-30 сут в пластиковые горшки

вместимостью 0,8 л. В качестве субстрата использовали заправленный комплексным минеральным удобрением (N — 100-120 мг/л, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 120-220 мг/л, K<sub>2</sub>O — 140-240 мг/л, 14:16:18) и известью (рН 5,5-6,5) измельченный торф Klasmann TS-1 («Klasmann-Deilmann GmbH», Германия). Полив и подкормки минеральными удобрениями проводили по мере необходимости.

Для подсчета хлоропластов использовали листья растений согласно описанию (15) с незначительными модификациями: сегмент листа промывали проточной водопроводной водой для удаления воскового налета и пыли, пинцетом с нижней стороны листа снимали слой эпидермы, помещали его на предметное стекло в каплю 1 % раствора нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>), накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом Axioskop 40 («Carl Zeiss», Германия). Учет хлоропластов осуществляли в 10 парах замыкающих клеток устьиц каждого образца при увеличении ×400. Прямой подсчет числа хромосом выполняли на мейотических клетках пыльников молодых бутонов. Материал, отобранный в утренние часы, фиксировали смесью 96 % этанола с ледяной уксусной кислотой (3:1). Постоянные цитологические препараты готовили методом распластывания (16) с некоторыми модификациями. Перед приготовлением постоянных препаратов проводили предварительный отбор бутонов с делящимися клетками. Для определения стадии развития клеток и фазы мейотического деления из каждого бутона извлекали по одному пыльнику и готовили временный препарат методом раздавливания в капле ацетокармина. Бутоны, делящиеся клетки которых находились в анафазе I и II, отбирали для приготовления постоянных препаратов.

Фиксированный материал промывали проточной водой в течение 15 мин, отделяли пыльники и помещали их по 5-10 шт. в пробирки типа Eppendorf (1,5 мл) с раствором ферментов (пектиназа из *Aspergillus niger* — 13,5 ед/мл, целлюлаза из *Trichoderma reesei* — 80,0 ед/мл, «Serva», Германия) в цитратном буфере (рН 4,8) и инкубировали на водяной бане при температуре 37 °С в течение 50-70 мин. Пипеткой аккуратно извлекали пыльник на предметное стекло, добавляли каплю 60 % уксусной кислоты, тщательно измельчали с помощью препаровальных игл и выдерживали в течение 1 мин. Полученную суспензию обводили фиксатором (3:1) по кругу и 1-2 каплями в центр распластывали клетки. Полученный препарат ополаскивали 96 % этанолом, подсушивали и окрашивали 1 % раствором Гимза в фосфатном буфере (рН 6,9-7,0) в течение 10-15 мин, после чего промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Препараты анализировали с помощью иммерсионной системы микроскопа Axioskop 40 («Carl Zeiss», Германия). Подсчет хромосом осуществляли в 10-15 метафазных и/или анафазных пластинках каждого образца при увеличении ×630.

Определение коэффициентов корреляции, вычисление достоверности различий по вариантам опыта с использованием дисперсионного анализа и расчет доверительного интервала на основе *t*-распределения Стьюдента при уровне значимости 0,05 проводили с использованием статистического пакета программы Microsoft Excel 2010.

**Результаты.** Среднее число хлоропластов замыкающих клеток устьиц у растений капусты пекинской (*B. rapa*) и озимого рапса (*B. napus*) мы определяли в популяциях линий растений-регенерантов — гаплоидов и удвоенных гаплоидов, полученных в культуре изолированных микроспор. В каждой из семи популяций капусты пекинской и четырех — рапса выделилось по две группы растений. В первой группе анализируемый показатель составил 5,50 шт., во второй — 9,95 шт. у капусты пекинской (табл. 1, табл. 2) и соответственно 9,85 и 17,03 шт. — у рапса (см. табл. 2, 3).

**1. Среднее число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц у гаплоидных и диплоидных растений-регенерантов капусты пекинской (*Brassica rapa*), полученных в культуре изолированных микроспор**

Популяция	Гаплоид			Диплоид			Соотношение у диплоидов и гаплоидов
	число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		
		$\bar{X} \pm \chi^1, 2$	варьирование		$\bar{X} \pm \chi^1, 2$	варьирование	
МЕДН	16	5,29±0,46 <sup>a</sup>	4,2-6,9	47	9,71±0,30 <sup>a</sup>	7,9-12,0	1,84
(МЧЕ)ДН	20	5,42±0,45 <sup>a</sup>	4,3-7,8	21	9,51±0,44 <sup>a</sup>	7,9-11,6	1,75
XMDH	24	5,28±0,30 <sup>a</sup>	4,3-7,4	25	9,66±0,24 <sup>a</sup>	8,5-10,8	1,83
Ха642ДН	6	5,16±0,27 <sup>a</sup>	4,5-5,8	6	9,05±0,50 <sup>ac</sup>	8,4-11,1	1,75
MlchДН	9	6,23±0,41 <sup>b</sup>	4,8-7,7	19	11,29±0,42 <sup>b</sup>	8,6-13,6	1,81
Кит1-3ДН	8	5,76±0,57 <sup>ab</sup>	4,9-6,8	6	10,55±1,35 <sup>ab</sup>	8,4-12,2	1,83
ТПВ36ДН	2	4,90±1,27 <sup>ab</sup>	4,8-5,0	10	8,45±0,41 <sup>c</sup>	7,9-9,5	1,72
Всего	85	5,50±0,17	4,2-7,8	134	9,95±0,20	7,9-13,6	1,81

Примечание. ЧХЗКУ — число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц; 1 — доверительный интервал на основе *t*-распределения Стьюдента при уровне значимости 0,05; 2 — значения в столбце, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, b, с), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента; 3 — семенное потомство исходного растения-донора, использованного в культуре изолированных микроспор.

**2. Среднее число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц у растений *Brassica* с разным уровнем пloidности**

Культура	Вид	Гаплоид	Диплоид	Тетраплоид
Капуста пекинская	<i>B. rapa</i>	5,50 <sup>a</sup>	9,95 <sup>b</sup>	—
Рапс	<i>B. napus</i>	9,85 <sup>a</sup>	17,03 <sup>b</sup>	—
Капуста белокочанная	<i>B. oleracea</i>	8,53 <sup>a</sup>	13,46 <sup>b</sup>	21,28 <sup>c</sup>

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, b, с), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента. Прочерки означают отсутствие данных.

**3. Среднее число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц у гаплоидных и диплоидных растений озимого рапса (*Brassica napus*)**

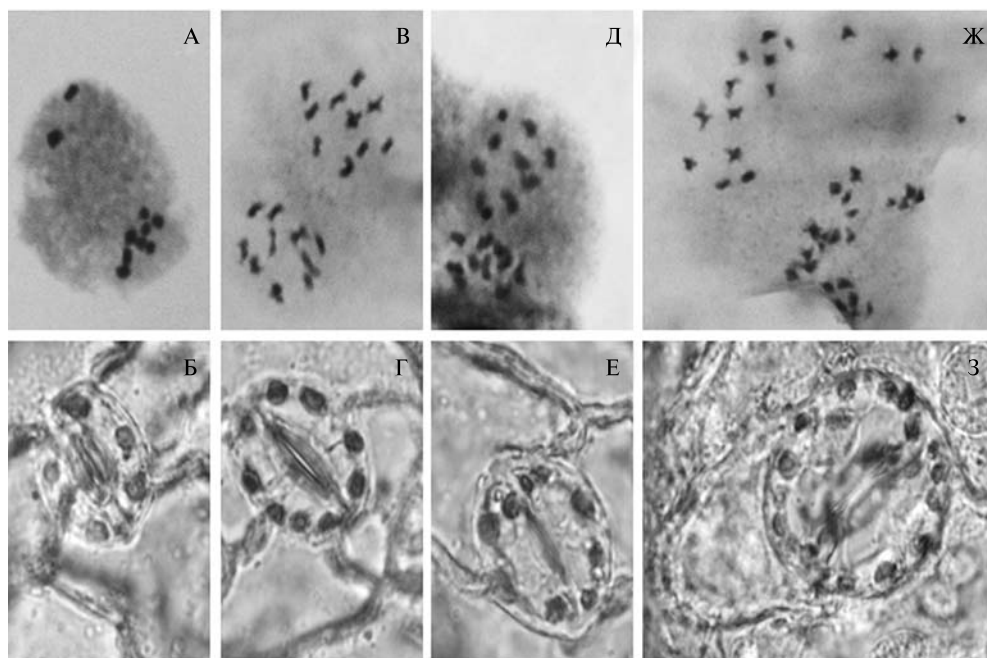
Популяция	Гаплоид			Диплоид			Соотношение у диплоидов и гаплоидов
	число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		
		$\bar{X} \pm \chi^1, 2$	варьирование		$\bar{X} \pm \chi^1, 2$	варьирование	
РС23 <sup>3</sup>	—	—	—	3	17,97±0,76 <sup>a</sup>	17,7-18,3	—
РС23ДН	37	9,55±0,35 <sup>a</sup>	7,5-11,9	12	16,48±0,88 <sup>a</sup>	14,5-18,4	1,73
Северянн <sup>3</sup>	—	—	—	3	16,27±1,46 <sup>a</sup>	15,6-16,7	—
СевДН	19	10,19±0,44 <sup>b</sup>	8,5-11,8	5	17,94±2,49 <sup>a</sup>	14,9-20,3	1,76
Гал1 <sup>3</sup>	—	—	—	3	16,23±1,86 <sup>a</sup>	15,5-17,0	—
ГалДН	23	9,95±0,31 <sup>ab</sup>	8,7-11,5	6	17,58±1,29 <sup>a</sup>	16,0-19,4	1,77
Лим1 <sup>3</sup>	—	—	—	2	17,40±1,05 <sup>a</sup>	17,1-17,7	—
ЛимДН	28	9,95±0,40 <sup>ab</sup>	8,0-12,4	5	16,36±2,65 <sup>a</sup>	14,1-19,7	1,64
Всего	107	9,85±0,19	7,5-12,4	39	17,03±0,46	14,1-20,3	1,73

Примечание. ЧХЗКУ — число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц; 1 — доверительный интервал на основе *t*-распределения Стьюдента при уровне значимости 0,05; 2 — значения в столбце, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, b, с), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента; 3 — семенное потомство исходного растения-донора, использованного в культуре изолированных микроспор. Прочерки означают отсутствие данных.

Сравнение комплекса морфологических признаков у растений-регенерантов на стадии цветения (толщина стебля, размер листьев, размер и фертильность/стерильность цветков) выявило их гаплоидный уровень в первой группе и диплоидный — во второй, что было подтверждено цитологическим анализом материнских клеток пыльцы у нескольких типичных для каждой группы растений (рис. 1).

По признаку ЧХЗКУ популяции линий с одинаковой пloidностью как у капусты пекинской, так и у рапса оказались достаточно однородными (за исключением одной-двух популяций), что позволяет сделать заключение о незначительном влиянии генотипа на этот показатель в пределах представленной выборки и, возможно, подвида. Примечательно также отсутствие значимых различий между диплоидными растениями-регенерантами рапса, полученными в культуре микроспор, и растениями из семен-

ного потомства у исходных донорных форм.



**Рис. 1.** Хромосомы делящихся материнских клеток пыльцы (анафаза I) (верхний ряд) и замыкающие клетки устьиц с хлоропластами (нижний ряд) у представителей *Brassica* с разной плоидностью: А, Б — гаплоид ( $n = 10$ , число хлоропластов в замыкающих клетках ЧХЗКУ = 5 шт.), В, Г — диплоид ( $2n = 20$ , ЧХЗКУ = 9 шт.) капусты пекинской (*B. rapa*); Д, Е — амфигаплоид ( $n = 19$ , ЧХЗКУ = 9 шт.), Ж, З — амфидиплоид ( $2n = 38$ , ЧХЗКУ = 19 шт.) рапса (*B. napus*). Окрашивание нитратом серебра, увеличение  $\times 630$ .

Минимальное и максимальное среднее число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц у растений капусты пекинской составило соответственно 4,2 и 7,8 шт. у гаплоидов и 7,9 и 13,6 шт. у диплоидов, у гаплоидных растений рапса — 7,5 и 12,4 шт., диплоидных — 14,1 и 20,3 шт. При отсутствии перекрытия максимальных значений среднего ЧХЗКУ у гаплоидных и минимальных — у диплоидных линий у капусты пекинской и рапса ЧХЗКУ у диплоидных растений в среднем превышало этот показатель у гаплоидных в примерно в 1,7-1,8 раза. Коэффициент корреляции Пирсона  $r$  для ЧХЗКУ и числа хромосом (уровня плоидности) у всех представленных гаплоидных и диплоидных растений капусты пекинской (219 шт.) составил  $0,90 \pm 0,03$ , рапса (146 шт.) —  $0,94 \pm 0,03$ .

В результате анализа среднего ЧХЗКУ растений-регенерантов у капусты белокочанной (*B. oleracea*) в популяциях ФарДН, ПарДН и НазДН выделили по три группы растений, в популяциях СюрДН и ЭтДН — по две (табл. 4). При цитологическом анализе делящихся клеток из бутонов и оценке фертильности пыльцы установили плоидность растений для всех групп. Группу с наименьшим ЧХЗКУ (8,53 шт.) представляли гаплоиды, с промежуточным (13,46 шт.) — диплоиды, с наибольшим (21,28 шт.) — тетраплоиды (рис. 2).

В популяциях ФарДН, ПарДН и НазДН у растений-регенерантов в гаплоидной группе сохранялась однородность проявления признака с пределом варьирования среднего числа хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц 7,7-9,9 шт. В то же время пределы варьирования в диплоидной (11,7-17,9 шт.) и тетраплоидных группах (18,0-26,5 шт.) оказались

очень широки и, как следствие, различия между популяциями растений-регенерантов существенны. Более того, были выявлены единичные растения-регенеранты со значимо большим числом хлоропластов, чем в тетраплоидной группе. Как правило, такие растения имели тетраплоидный набор с одной-двумя дополнительными хромосомами (данные не представлены).

#### 4. Среднее число хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц у гаплоидных, диплоидных и тетраплоидных растений-регенерантов капусты белокочанной (*Brassica oleracea*), полученных в культуре изолированных микроспор

Популяция	Гаплоид			Диплоид			Тетраплоид		
	число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.		число растений, шт.	среднее ЧХЗКУ, шт.	
		$\bar{X} \pm x^1, 2$	варьи-рование		$\bar{X} \pm x^1, 2$	варьи-рование		$\bar{X} \pm x^1, 2$	варьи-рование
ФарДН	6	8,27±0,63 <sup>a</sup>	7,7-8,9	36	12,76±0,24 <sup>a</sup>	11,7-14,2	17	20,31±0,66 <sup>a</sup>	18,0-22,7
СюрДН	—	—	—	9	12,72±0,37 <sup>a</sup>	11,7-13,4	5	20,70±2,59 <sup>ac</sup>	19,0-23,3
ЭтДН	—	—	—	5	15,36±0,56 <sup>b</sup>	13,0-16,8	2	22,60±0,93 <sup>bc</sup>	21,6-23,6
ПарДН	3	9,30±0,53 <sup>a</sup>	8,5-9,9	5	15,24±0,44 <sup>b</sup>	13,4-16,3	2	23,60±2,44 <sup>bc</sup>	20,7-26,5
НазДН	1	7,80±0,30 <sup>a</sup>	7-8	6	15,65±0,72 <sup>b</sup>	14,5-17,9	3	25,30±0,48 <sup>b</sup>	24,9-26,1
Итого	10	8,53±0,56	7,7-9,9	61	13,46±0,38	11,7-17,9	29	21,28±0,87	18,0-26,5

Примечание. ЧХЗКУ — число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц; 1 — доверительный интервал на основе *t*-распределения Стьюдента при уровне значимости 0,05; 2 — значения в столбце, отмеченные одинаковыми строчными буквами (a, b, c), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента; 3 — семенное потомство исходного растения-донора, использованного в культуре изолированных микроспор. Прочерки означают отсутствие данных.

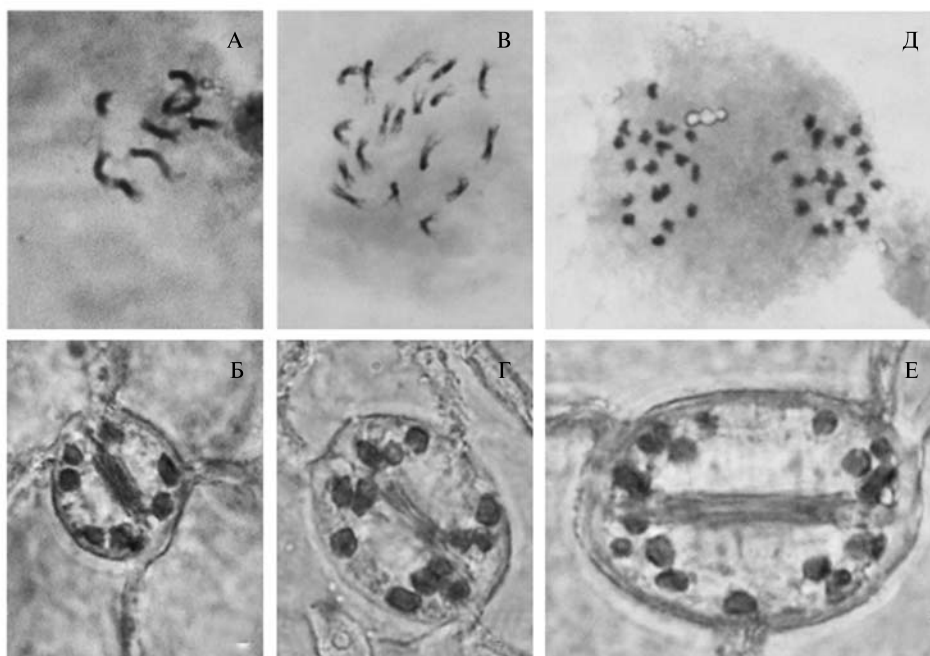


Рис. 2. Хромосомы делящихся материнских клеток пыльцы (метафаза I) (верхний ряд) и замыкающие клетки устьиц с хлоропластами (нижний ряд) у капусты белокочанной (*Brassica oleracea*) с разной пloidностью: А, Б — гаплоид ( $n = 9$ , число хлоропластов в замыкающих клетках ЧХЗКУ = 8 шт.); В, Г — диплоид ( $2n = 18$ , ЧХЗКУ = 13 шт.); Д, Е — тетраплоид ( $4n = 36$ , ЧХЗКУ = 20 шт.). Окрасивание нитратом серебра, увеличение  $\times 630$ .

Подсчет ЧХЗКУ у растений 22 инбредных диплоидных линий белокочанной капусты с разным сроком созревания выявил, что этот показатель варьировал в зависимости от генотипа в широких пределах — от 11,1 до 19,2 шт., при этом отношение максимального среднего для генотипа значения к минимальному составило 1,73 (рис. 3). Такое различие сопоставимо с отношением средних чисел хлоропластов у диплоидных ( $2\times$ ) и гаплоидных ( $1\times$ ) растений капусты пекинской и рапса. Объедине-

ние в группы по скороспелости показало, что у скороспелых линий величина ЧХЗКУ была в пределах 15,7-19,2 шт., тогда как у среднеспелых — 14,4-16,3 шт. и у позднеспелых — 11,1-14,7 шт. Таким образом, нами впервые отмечена тенденция к формированию большего числа хлоропластов ЗКУ у растений белокочанной капусты раннеспелых линий и меньшего — у позднеспелых, что, вероятно, связано с биологическими особенностями их роста и развития и не учитывалось предыдущими авторами (15) при разделении регенерантов по плоидности.

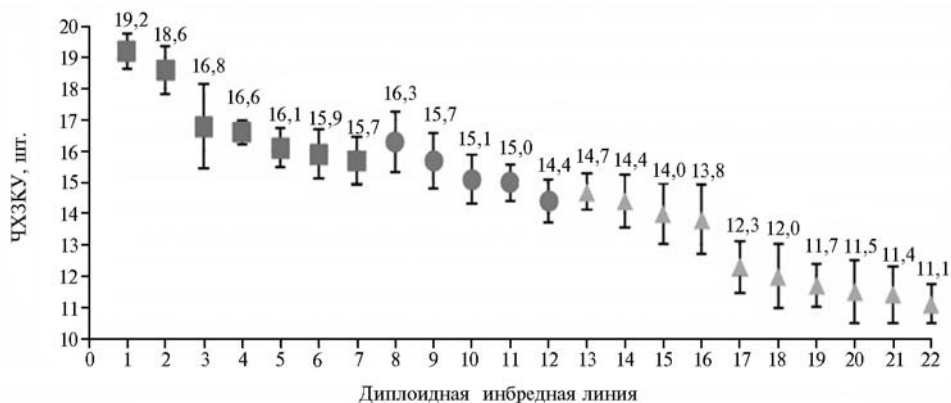


Рис. 3. Среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (ЧХЗКУ) у диплоидных (2n) линий капусты белокочанной *Brassica oleracea* с разным сроком созревания: 1 — Пл, 2 — Сюс1, 3 — Эт1, 4 — Сф, 5 — Ш5а, 6 — Дпп2, 7 — Дт (■, раннеспелые, вегетационный период от всходов до технической спелости 80-100 сут); 8 — Ак3, 9 — Мер1, 10 — Б25, 11 — Юф1, 12 — С110 (●, среднеспелые, вегетационный период 110-140 сут); 13 — Фл4, 14 — Пр3, 15 — Вб4, 16 — Хт5, 17 — Пм4, 18 — Фу44, 19 — Бю1, 20 — АМ2, 21 — Са1, 22 — Гэс2 (▲, позднеспелые, вегетационный период 150-180 сут). Погрешности отражают доверительный интервал на основе *t*-распределения Стьюдента при уровне значимости 0,05.

Зависимость ЧХЗКУ от скороспелости изученных генотипов и широкий разброс значений у растений-регенерантов с одинаковой плоидностью в представленных популяциях затрудняет установление точных пределов варьирования числа хлоропластов, позволяющих с высокой долей вероятности определять плоидность растений капусты белокочанной. При этом существенные различия по ЧХЗКУ у гаплоидных, ди- и тетраплоидных растений капусты белокочанной (см. табл. 2) и высокий коэффициент корреляции между ЧХЗКУ и плоидностью ( $r = 0,94 \pm 0,03$ ) указывали на возможность точной дифференциации растений-регенерантов, полученных в культуре микроспор у ранее не исследованных генотипов, при условии наличия контроля — диплоидного донорного растения.

Эффективность использования показателя ЧХЗКУ зависит от стабильности проявления на различных стадиях развития растений и в различных условиях среды. Мы оценили влияние температуры на ЧХЗКУ у диплоидных растений капусты пекинской (*B. rapa*), капусты белокочанной (*B. oleracea*) и амфидиплоидных растений озимого рапса (*B. napus*) (табл. 5), а также изменчивость ЧХЗКУ в зависимости от возраста (стадии развития) растения (табл. 6).

Как видно из данных, представленных в таблицах 5 и 6, значения ЧХЗКУ у растений трех видов (капусты пекинской, капусты белокочанной и рапса) стабильно проявлялись в онтогенезе и существенно не различались на стадии 4-5 настоящих листьев и в начале цветения. Температура при выращивании тоже не оказала значимого влияния на величину ЧХЗКУ у пяти генотипов, представляющих три вида *Brassica*. При этом следует от-



метить, что полученные показатели не отличались от зарегистрированных у растений-регенерантов — удвоенных гаплоидов этих диплоидных видов.

#### 5. Число хлоропластов (шт.) в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидного видов *Brassica* в зависимости от температурных условий

Популяция, сорт	Вид	Температура, °С	
		6	22
F <sub>1</sub> Гидра	<i>B. rapa</i>	9,97 <sup>a</sup>	10,30 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub> Нежность	<i>B. rapa</i>	10,45 <sup>a</sup>	11,00 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub> СБ-3	<i>B. oleracea</i>	12,00 <sup>a</sup>	12,23 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub> Валентина	<i>B. oleracea</i>	12,45 <sup>a</sup>	12,20 <sup>a</sup>
Северянин	<i>B. napus</i>	17,50 <sup>a</sup>	17,45 <sup>a</sup>

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента.

#### 6. Число хлоропластов (шт.) в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидного видов *Brassica* в зависимости от стадии развития растения

Популяция, сорт	Вид	Стадия развития	
		4-5 настоящих листьев	цветение
Ха642	<i>B. rapa</i>	10,75 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>
Бю16	<i>B. oleracea</i>	11,70 <sup>a</sup>	12,0 <sup>a</sup>
Северянин	<i>B. napus</i>	16,90 <sup>a</sup>	17,0 <sup>a</sup>

Примечание. Значения в строке, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а), не имеют существенного различия на 5 % уровне значимости ( $P \leq 0,05$ ) согласно *t*-критерию Стьюдента.

Таким образом, существенное различие по числу хлоропластов в ЗКУ, которое было выявлено у гаплоидов и удвоенных гаплоидов капусты пекинской, белокочанной и рапса, позволяет с высокой точностью дифференцировать растения по плоидности. Однако утверждать, что установленные характерные для соответствующих уровней плоидности числовые значения (ЧХЗКУ) абсолютны и неизменны для изученных видов, некорректно. В частности, несмотря на практически полное соответствие среднего числа хлоропластов в ЗКУ установленному в ранних работах для *B. rapa* (5), есть небольшое расхождение с другими данными по *B. rapa* (13), *B. napus* (12) и *B. oleracea* (14), что, вероятно, объясняется более широким разнообразием генотипов, вовлеченных в наше исследование, по сравнению с использованными в упомянутых сообщениях, а также зависимостью от биологических особенностей форм (в первую очередь, от продолжительности вегетационного периода) и, возможно, от внешних факторов, не учтенных в настоящей работе.

Итак, среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидных растений капусты пекинской (*Brassica rapa*) составило 4,2-7,8, у диплоидных — 7,9-13,6; у амфигаплоидных растений рапса (*B. napus*) — 7,5-12,4, амфидиплоидных — 14,1-20,3 шт.; у гаплоидных растений капусты белокочанной (*B. oleracea*) — 7,7-9,9 шт., диплоидных — 11,7-17,9 шт. и тетраплоидных — 18,0-26,5 шт. При этом у капусты пекинской и рапса число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц не относится к генотипспецифичным признакам (у этих культур растения с одним уровнем плоидности независимо от сортовой принадлежности имеют одинаковое ЧХЗКУ). У капусты белокочанной выявлена зависимость ЧХЗКУ от скороспелости: показана тенденция к формированию большего числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у раннеспелых линий и меньшего — у позднеспелых. У диплоидных скороспелых инбредных линий ЧХЗКУ в 1,7 раза больше, чем у позднеспелых, что сопоставимо с различиями между гаплоидными и диплоидными растениями капусты пекинской или рапса. Температурный режим и возраст (или стадия развития) растения существенно не влияли на изменчивость и стабильность проявления изучаемого признака. По нашим данным, определение числа

хлоропластов в замыкающих клетках устьиц служит надежным методом оценки плоидности у *B. rapa*, *B. napus*, а также (принимая во внимание выявленные особенности) у *B. oleracea* и может быть использовано при рутинном анализе плоидности у растений-регенерантов, полученных в культуре микроспор, или в растительном материале другого происхождения.

ООО Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева,  
127550 Россия, г. Москва, ул. Пасечная, 5,  
e-mail: breedst@mail.ru, cokrat@hotmail.ru

Поступила в редакцию  
16 июня 2014 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2014, № 5, pp. 44-54

## A RELATIONSHIP BETWEEN PLOIDY LEVEL AND THE NUMBER OF CHLOROPLASTS IN STOMATAL GUARD CELLS IN DIPLOID AND AMPHIDIPOID *Brassica* SPECIES

S.G. Monakhos, M.L. Nguen, A.V. Bezbozhnaya, G.F. Monakhos

N.N. Timofeev Breeding Station, 5, Pasechnaya ul., Moscow, 127550 Russia, e-mail breedst@mail.ru, cokrat@hotmail.ru  
Received June 16, 2014 doi: 10.15389/agrobiol.2014.5.44eng

### Abstract

Doubled haploid lines production through isolated anthers and isolated microspores cultures has been used widely for genetic studies and plant breeding of *Brassica* crops. The ploidy level of microspore derived plants varies, and normally haploid, diploid and mixoploid plants could be obtained in vitro. The determination of ploidy level is essential in doubled haploid pure line production. The determination of ploidy level by counting the number of chloroplast in stomatal guard cells (NCSGC) is less time consuming, laborious and expensive comparing to chromosome counting in root tip cells or mother pollen cells and flow cytometry methods. Several studies have been reported concerning relationship between ploidy level and number of chloroplast in stomatal guard cells of *Brassica rapa*, *B. napus* and *B. oleracea* species, however a small number of genotypes had been analyzed. In our study, the NCSGCs of haploid ( $n$ ) and diploid ( $2n$ ) Chinese cabbage (*B. rapa* ssp. *pekinensis*), winter oilseed rape (*B. napus* var. *napus*) and haploid, di- and tetraploid white cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) microspore derived plants were estimated, and also the influence of plant growth temperature ( $6\pm 2$  °C и  $24\pm 2$  °C) and development stage (vegetative or generative) was investigated. High correlation between the ploidy level of microspore-derived plants and NCSGC is found for white cabbage (*Brassica oleracea*,  $r = 0.94$ ), Chinese cabbage (*B. rapa*,  $r = 0.90$ ) and oilseed rape (*B. napus*,  $r = 0.94$ ). The chloroplast average number in stomatal guard cells was very similar among the same ploidy genotypes of Chinese cabbage as well as rapeseed, while the variation of chloroplast number in diploid and tetraploid white cabbage plants was significant. In a range of early, middle and late maturing diploid white cabbage inbred lines there was established the tendency to form more chloroplasts in the early lines (PI, Sus and others) and less in the late lines (AM2, Sa1, Ges2 and others), with the difference up to 1.7 times, that is comparable to the difference between haploid and diploid plants of Chinese cabbage or rapeseed. The chloroplast number in stomatal guard cells is 4.2-7.8 and 7.9-13.6 for Chinese cabbage (*B. rapa*) haploids and diploids, respectively, 7.5-12.4 and 14.1-20.3 for rapeseed (*B. napus*) amphihaploids and amphidiploid, respectively, and 7.7-9.9, 11.7-17.9 and 18.0-26.5 for white cabbage (*B. oleracea*) haploids, diploids and tetraploids, respectively. No significant influence of vegetative or generative stage of plant development or growth temperature on NCSGC.

Keywords: haploid, diploid, white cabbage, Chinese cabbage, stomatal guard cells, number of chloroplasts, ploidy, rapeseed, tetraploid, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*.

### REFERENCES

1. Pink D., Bailey L., McClement S., Hand P., Mathas E., Buchanan-Wollaston V., Astley D., King G., Teakle G. Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas. *Euphytica*, 2008, 164: 509-514 (doi: 10.1007/s10681-008-9742-1).
2. Ferrie A.M.R., Mollers C. Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant. Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2010 (doi: 10.1007/s1124001098314).
3. Monakhos S., Uwiragiye A., Zhao J., Zhang N., Bonnema G. Generation of doubled haploids through microspore culture from vegetable and oilseed *Brassica rapa* crops. *Izv. TAA*, 2010, 7: 128-135.
4. Smykalova I., Vetrovcova M., Klima M., Machackova M., Griga M. Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the Breeding Project «Czech

- Winter Rape». *Czech J. Genet. Plant Breed*, 2006, 42(2): 58-71.
5. Hamaoka Y., Fujita Y., Iwai S. Number of chloroplasts in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris*. *Plant Tiss. Cult. Let.*, 1991, 8(2): 67-72.
  6. Murovec J., Bohanec B. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: *Plant breeding /I. Abdurakhmonov* (ed.). InTech, 2012: 87-106 (ISBN: 9789533079325, <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>) (doi: 10.5772/29982).
  7. Maluszynska J. Cytogenetic tests for ploidy level analyses – chromosome counting. In: *Doubled haploid production in crop plants: a manual /M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko* (eds.). Kluwer, Dordrecht, 2003: 391-395.
  8. Bohanec B. Ploidy determination using flow cytometry. In: *Doubled haploid production in crop plants: a manual /M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko* (eds.). Kluwer, Dordrecht, 2003: 397-403.
  9. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotech. J.*, 2010, 8: 377-424 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x).
  10. Cousin A., Heel K., Cowling W.A., Nelson M.N. An Efficient highthroughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. *Cytometry*, 2009, 75(12): 1015-1019 (doi: 10.1002/cyto.a.20816).
  11. Dias S.J.C. Protocol for broccoli microspore culture. In: *Doubled haploid production in crop plants: a manual /M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko* (eds.). Kluwer, Dordrecht, 2003: 195-204.
  12. Soroka A.I. Differentiation of haploid and dihaploid rape plants at the cytological and morphological levels. *Cytol. Genet.*, 2013, 47(2): 88-92 (doi:10.3103/S0095452713020102).
  13. Woo J.G., Kim H.D., Oh B.S. Estimation of the ploidy of anther derived Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* by the number of chloroplasts in the guard cells. *Res. Rep. Rur. Dev. Adm.*, 1991, 33: 35-39.
  14. Yuan S., Liu Y., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Sun P. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agr. Sci. in China*, 2009, 8: 939-946 (doi: 10.1016/S1671-2927(08)60298-9).
  15. Savitsky N. Effectiveness of selection for tetraploid plants in cogeneration on the basis of the number of chloroplasts in stomata. *J. A.S.S.B.T.*, 1966, 13(8): 655-661.
  16. Pukhal'skii V.A., Solov'ev A.A., Badaeva E.D., Yurtsev V.N. *Praktikum po tsitologii i tsitogenetike rastenii* [Practical works on plant cytology and cytogenetics: manual]. Moscow, 2007: 99-100.