

УДК 575.224.234.2: 58.085: [634.1+634.7]

**ЦИТОАНАТОМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ УРОВНЯ ПЛОИДНОСТИ
ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
заведующий лабораторией
element68@mail.ru

Муратова Светлана Александровна

кандидат биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией

Папихин Роман Валериевич

кандидат сельскохозяйственных наук,
начальник научного центра, доцент

Хорошкова Юлия Викторовна

аспирант

Шамшин Иван Николаевич

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Сурайкина Ирина Анатольевна

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. В статье рассмотрены основные цитологические признаки плодовых и ягодных растений, возделываемых в культуре *in vitro*, которые являются маркерами их уровня ploидности. Данные признаки можно использовать для предварительного отбора генотипов с увеличенным числом

хромосомных наборов.

Ключевые слова: плодовые и ягодные культуры, полиплоидия, уровень плоидности, цитоанатомические маркерные признаки, *in vitro*.

Полиплоидия является геномной мутацией, приводящей к увеличению хромосомных наборов у организмов. В случае эуплоидии такое увеличение происходит в количество раз, кратное базовому числу хромосом (x), характерному для данного систематического таксона. У растений в природных условиях полиплоидия является естественным механизмом увеличения уровня плоидности, потенциально увеличивающим их многие количественные показатели при естественном отборе и видообразовании [3, 16]. В селекции экспериментальная полиплоидизация растительных клеток и тканей служит одним из практических методов создания качественно новых форм, позволяя получить растения с комплексом ценных хозяйственно-биологических признаков [3, 5, 11]. Экспериментально контролируемые условия *in vitro* являются эффективными для длительного возделывания, получения и сохранения ценных полиплоидных форм растений [4, 6, 15, 19, 21]. При создании новых форм растений с помощью искусственной полиплоидизации их тканей важной задачей является выделение генотипов с увеличенным уровнем плоидности. Это возможно осуществить как с помощью непосредственного подсчета хромосом в клетках их тканей, так и при анализе морфологических и цитоанатомических признаков данных растений.

Селекция растительных форм измененного уровня плоидности развивается в течение нескольких десятилетий, поэтому основные принципы выделения гетероплоидов известны и оптимизированы для многих групп растений (рис. 1).

Прямой подсчет числа хромосом на окрашенных микропрепаратах клеток является наиболее точным и надежным методом определения уровня плоидности растения, но сложен и продолжителен в случае значительной выборки генотипов. Кроме того, большинство плодовых и ягодных культур имеют мелкие хромосомы (около 1-3 мкм) и низкий митотический индекс, что затрудняет получение качественных метафазных пластинок на микропрепарате и существенно увеличивает время подсчета хромосом. Поэтому косвенные методы диагностики плоидности позволяют быстрее провести отбор гетероплоидов, хотя каждый из

них имеет определенные недостатки, ограничивающий его применение.



Рисунок 1 – Схема методических приемов определения уровня пloidности растительных клеток и тканей

Цитометрический анализ базируется на закономерности изменения размеров клеток и количественных показателей их органелл у растений с разным уровнем пloidности [2, 3, 8-11, 13, 17, 20].

Целью наших исследований являлось изучение основных морфологических и цитоанатомических признаков плодовых и ягодных растений с различным количеством наборов хромосом, возделываемых в культуре *in vitro*, для выявления среди них маркеров уровня пloidности при предварительном отборе полипloidных генотипов.

Объектами исследования служили плодовые и ягодные растения – клоновые подвои и гибриды яблони селекции университета, формы рябино-грушевого

гибрида №136, ежевики, смородины, характеризующиеся кратно увеличенным числом хромосомных наборов. Все растения культивировали *in vitro* по стандартным биотехнологическим методикам [14, 18, 23, 24]. Микропрепараты готовили согласно общепринятым методам [1, 7, 12, 22].

Установлено, что в группе морфологических маркерных признаков уровня плоидности высокой стабильностью и наименьшим коэффициентом вариации характеризуется листовая индекс (иногда называемый также индексом формы листа) – отношение ширины листовой пластинки к ее длине. Ее цитоанатомическими составляющими являются линейные размеры клеток листа. Так, у смородины американской (*Ribes americanum* Mill.) при достоверном различии средних значений длины и ширины листовой пластинки у форм разного уровня плоидности, коэффициент вариации размеров листа диплоида составляет 25-27%, тетраплоида – 35-41%, при этом по листовому индексу у диплоида $C_v=10,1\%$, у тетраплоида $C_v=12,4\%$. Средние значения индекса формы листовой пластинки у смородины американской разного уровня плоидности различаются на достоверном уровне при частичном перекрытии значений данного признака между генотипами (рис. 2).

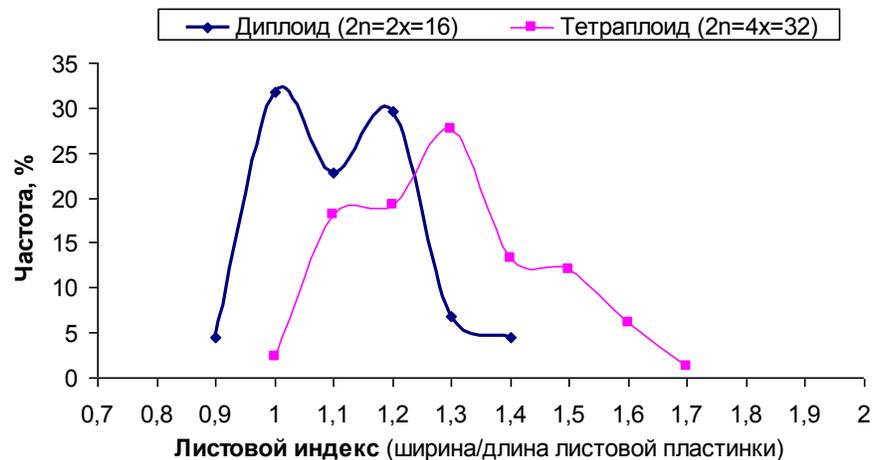


Рисунок 2 – Варьирование значений индекса формы листовой пластинки у смородины американской разного уровня плоидности

Минимальным коэффициентом вариации у генотипов яблони на уровне 6,6-7,4% характеризуется листовая индекс, показатели длины и ширины листовой пластинки отличаются большей величиной вариабельности – соответственно 9,4-9,8% и 10,9-21,2%. Аналогичные показатели отмечены как у исходных разнохромосомных сортов, так и экспериментальных клоновых подвоев яблони различного уровня плоидности (рис. 3).

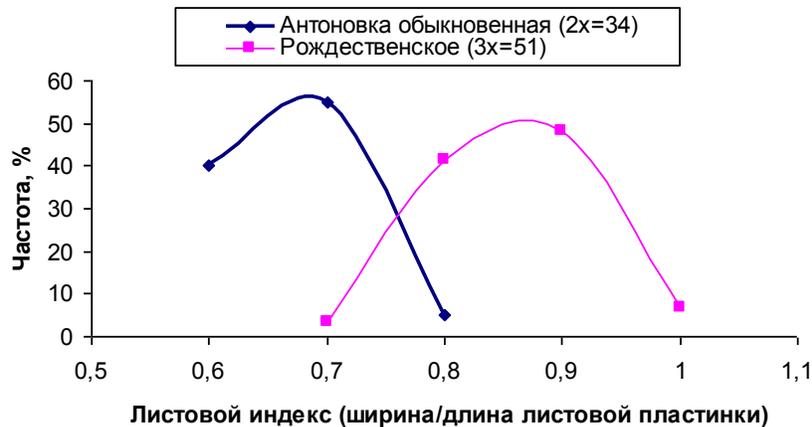


Рисунок 3 – Варьирование значений индекса формы листовой пластинки у сортов яблони различного уровня плоидности

Основными морфометрическими показателями любой клетки являются ее линейные размеры (длина, ширина или диаметр), соотношение площадей или объемов ядра к всей клетке, количество определенных органоидов.

При анализе листовых пластинок микрочеренков, культивируемых *in vitro*, наиболее удобным является изучение эпидермальной ткани, все клетки которой, за исключением устьиц, лишены хлоропластов. В процессе анализа размеров замыкающих клеток устьиц и количества хлоропластов в них установлено их вариабельность в зависимости от уровня плоидности растений и клеток.

В результате проведенных исследований установлено, что среди цитометрических показателей наименьшим варьированием характеризуется длина замыкающих клеток устьиц, количество хлоропластов в них, а также ядерно-цитоплазматическое отношение клеток. По размеру устьиц у генотипов разного

уровня плоидности рода *Malus* Mill. коэффициент вариации не превышает 10%, рода *Rubus* L. – 28%; по количеству хлоропластов – соответственно 14% и 26%. Отмечена высокая положительная корреляция между длиной замыкающих клеток устьиц и количеством хлоропластов в них – у генотипов разного уровня плоидности рода *Malus* Mill. на уровне +0,71...+0,80; рода *Rubus* L. (на примере разнохромосомных сортов ежевики) +0,90; исходного диплоида отдаленного рябино-грушевого гибрида №136 и экспериментально полученного тетраплоида +0,92.

Среди генотипов ежевики (род *Rubus* L.) разного уровня плоидности существенные различия отмечены по длине замыкающих клеток устьиц – в 2,3 раза, по ширине – в 2,5 раза, количеству хлоропластов в одной клетке – в 1,9 раза. Коэффициент вариации по длине замыкающих клеток устьиц у ежевики составляет 8-10%, ширине – 12-15%, количеству хлоропластов – 16-20%.

В результате проведенных исследований было отмечено, что ядерно-цитоплазматическое отношение в соматических и генеративных клетках вследствие своего постоянства средних значений не является цитоанатомическим маркером уровня плоидности генотипов в пределах одного таксономического рода.

Таким образом, установлено, что повышенной стабильностью и наименьшим коэффициентом вариации (C_v не более 10%) для плодовых и ягодных культур среди цитологических признаков характеризуется длина замыкающих клеток устьиц и количество хлоропластов в них. Выявлена высокая положительная корреляция (+0,7...+0,9) между длиной замыкающих клеток устьиц и количеством хлоропластов в них.

Исследования выполнены в рамках проекта № 5-МУ-19(02) при финансовой поддержке Управления образования и науки Тамбовской области и Совета молодых ученых и специалистов Тамбовской области.

Список литературы:

1. Биохимическая оценка плодов голубики высокой и барбариса в условиях Тамбовской области / И.Б. Кирина, Д.М. Брыксин, И.А. Иванова // Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса юга России: сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 70- летию Победы и 40-летию инженерного факультета. - Махачкала, 2015. - С. 144-148.
2. Бормотов, В.Е. Полиплоидия и полиморфизм растений по величине клеток / В.Е. Бормотов, Т.И. Лопатина. – Минск, 1986. – 165 с.
3. Бреславец, Л.П. Полиплоидия в природе и опыте / Л.П. Бреславец. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 364 с.
4. Григорьева, Л.В. Влияние регуляторов роста при микроклональном размножении смородины черной / Л.В. Григорьева, Н.А. Куликова, О.Г. Гиченкова // Известия нижеволжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – № 3 (51). – Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2018. – С. 50-55.
5. Григорьева, Л.В. Современные способы размножения ягодных культур / Л.В. Григорьева, О.Г. Гиченкова, Н.А. Куликова // Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства: Материалы I междунар. науч.-практ. конф. – Т. 2. – Макеевка: ГОУ ВПО Донбасская аграрная академия, 2018. – С. 40-43.
6. Дубровский, М.Л. Оптимизация углеводного состава питательной среды для проращивания *in vitro* пыльцы яблони / М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, А.В. Кружков // Сб.: Наследие академика Н.В. Цицина. Современное состояние и перспективы развития: материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию Н.В. Цицина, 2019. - С. 45-47.
7. Кирина, И.Б. Задачник по генетике: учебное пособие / И.Б. Кирина,

Ф.Г. Белосохов, Л.В. Титова. - Мичуринск: Издательство Мичуринский государственный аграрный университет, 2020. - 155 с.

8. Кожабаев, Ж.И. Устьичный аппарат листьев как показатель плоидности гибридов сахарной свеклы / Ж.И. Кожабаев, К.Т. Конысбеков, Г.А. Дуйсенбекова // Научное пространство Европы – 2012: материалы международной научно-практической конференции. – М.: Изд-во «Руснаука», 2012. – С. 147-149.

9. Коломиец, О.О. Цитометрическое определение плоидности у микроклональных регенерантов томата / О.О. Коломиец, И.В. Павлова, С.В. Глушен // Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства. – Самохваловичи: Институт овощеводства, 2014. – С. 184-186.

10. Кучковская, Е.В. Влияние уровня плоидности на морфометрические показатели вегетативной и генеративной сфер томата: Дис. ... канд. биол. Наук / Е.В. Кучковская. – М., 2003. – 173 с.

11. Лаптев, Ю.П. Гетероплоидия в селекции растений / Ю.П. Лаптев. – М.: Колос, 1984. – 248 с.

12. Методические рекомендации по применению цитологических методов в плодководстве / Под ред. Н.П. Романовой. – М., 1988. – 52 с.

13. Мокроносов, А.Т. Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата при полиплоидии / А.Т. Мокроносов, Г.П. Федосеева // Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. – Новосибирск: Наука, 1982. – С. 45-62.

14. Муратова, С.А. Размножение садовых культур *in vitro*: методические рекомендации / С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская. – Мичуринск-наукоград РФ, 2008. – 68 с.

15. Папихин, Р.В. Влияние колхицина на индукцию полиплоидии у гибридов семечковых плодовых культур в условиях *in vitro* / Р.В. Папихин, С.А. Муратова, Д.О. Горлов // В книге: Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы IV международной научно-

практической конференции, 2019. - С. 234-236.

16. Полиморфизм дикорастущих видов рода *MALUS MILL.* по гену (MD-EXP-7) биосинтеза экспансина / Н.И. Савельев, И.Н. Шамшин, Н.Н. Савельева, А.С. Лыжин // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2014. - Т. 18. - № 4-1. - С. 713-717.

17. Связь пloidности 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 // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 5. – С. 44-54.

18. Способы получения безвирусных садовых культур / Р.В. Папихин, С.А. Муратова, М.Л. Дубровский [и др.] // Наука и Образование. - 2020. - № 1. - С. 87.

19. Субботина, Н.С. Влияние ауксинов на ризогенез ежевики сортов Дирксен Торнлесс и Блэк Сэтин в культуре *in vitro* / Н.С. Субботина, Ю.В. Хорошкова, С.А. Муратова // Сб.: Научные инновации - аграрному производству: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию юбилею Омского ГАУ, 2018. - С. 933-938.

20. Цаценко, Л.В. Пыльцевой анализ в селекции растений / Л.В. Цаценко, А.С. Синельникова // Научный журнал КубГАУ. – 2012. - № 77 (03). -11 с. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/09.pdf> (дата обращения 05.11.2020).

21. Чурикова, Н.Л. Оценка способности к укоренению подвойных форм яблони в условиях *in vitro* / Н.Л. Чурикова, Д.О. Горлов, С.А. Муратова [и др.] / Сборник научных трудов, посвященный 85-летию Мичуринского государственного аграрного университета. В 4-х томах. – Мичуринск, 2016. - С. 271-277.

22. Dubrovsky, M.L. Analysis of the karyotype of the russian apple tree clonal rootstocks bred at the Michurinsk State Agrarian University / M.L. Dubrovsky, R.V. Papikhin // Amazonia Investiga. - 2019. - Т. 8. - № 21. - С. 688-698.

23. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15. - №13. – P. 473-497.

24. Quoirin, M. Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. / M. Quoirin, P. Lepoivre // *Acta Hortic.* – 1977. – V. 78. – P. 437-442.

UDC 575.224.234.2: 58.085: [634.1+634.7]

**CYTOANATOMICAL MARKERS OF PLOIDY LEVEL OF FRUIT AND
BERRY PLANTS AT *IN VITRO* CULTURE**

Dubrovsky Maxim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor,
Head of Laboratory
element68@mail.ru

Muratova Svetlana Alexandrovna

Candidate of Biological Sciences, Professor,
Head of Laboratory

Papikhin Roman Valerievich

Candidate of Agricultural Sciences,
Head of the Scientific Center, Associate Professor

Khoroshkova Yulia Viktorovna

graduate student

Shamshin Ivan Nikolaevich

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory

Suraykina Irina Anatolyevna

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor
Michurinsk State Agrarian University

Annotation. The article discusses the main cytoanatomical features of fruit and berry plants, cultivated *in vitro*, which are markers of their ploidy level. These features can be used for preliminary selection of genotypes with an increased number of basic chromosome sets.

Key words: fruit and berry crops, polyploidy, ploidy level, cytoanatomical marker features, *in vitro*.