

А.И. СОРОКА

Институт масличных культур НААН Украины,
Запорожская обл., с. Солнечное
E-mail: oilseed@mail.zp.ua

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА НА ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ И МОРФОЛОГИЧЕСКОМ УРОВНЯХ



Изучали некоторые цитологические и морфологические особенности гаплоидных и дигаплоидных растений рапса озимого, полученных методом культуры пыльников. Показано, что у гаплоидных растений количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и размер самих замыкающих клеток устьиц были значительно меньшими, а количество устьиц на единицу площади — большим, чем у удвоенных гаплоидов и диплоидов. Гаплоиды характеризовались также меньшими размерами лепестков и пыльников и, в целом, цветка по сравнению с дигаплоидами и диплоидами.

© А.И. СОРОКА, 2013

Введение. Использование половых клеток с гаплоидным набором хромосом позволяет получить константный гомогенный материал значительно быстрее, чем традиционными полевыми методами. Так, если перевод на гомозиготный уровень новой гибридной формы требует в полевых условиях 4–6 лет, то использование методов экспериментальной гаплоидии позволяет выполнить эту операцию в течение одного семенного поколения, т.е. за один-два года. Наиболее часто для этих целей применяют методы, основанные на культуре пыльников и микроспор, хотя в ряде случаев используют и женские гаметы. В частности, получение гаплоидов методами андрогенеза на сегодняшний день является одним из общепризнанных способов для создания константных коммерческих линий ряда сельскохозяйственных культур. Женские половые клетки используют значительно реже, когда применение мужских гамет затруднительно или малоэффективно [1–4].

У такой масличной и технической культуры, как рапс, для получения гаплоидов наиболее широкое применение нашли методы культуры пыльников и микроспор [3, 5–8]. В первом случае используют пыльники с микроспорами, во втором — культивируют уже выделенные из пыльников микроспоры. Оба метода предполагают подбор таких условий искусственного культивирования, когда происходит образование преимущественно гаплоидных структур. При этом частота образования гаплоидов может быть достаточно высокой, хотя и остается ряд вопросов, связанных в первую очередь со специфической реакцией генотипа на культуру *in vitro*, а также с условиями выращивания растений-доноров, типом морфогенеза микроспоры и некоторыми другими аспектами, такими как влияние температурного фактора или наличие особого гормонального фона [9–12].

Поскольку растения при культивировании пыльников образуются из гаплоидных структур, они чаще всего имеют гаплоидный набор хромосом. Часть растений, тем не менее, могут быть и удвоенными гаплоидами (иногда их называют дигаплоидами) вследствие спонтанного удвоения хромосом в культуре *in vitro* или воздействия специфических агентов, типа колхицина, ингибитора образования ахроматинового веретена в процессе клеточного

деления. Практический интерес для последующей работы представляют как правило удвоенные гаплоиды. Визуально же отличать гаплоидные растения от дигаплоидов не всегда представляется возможным.

В литературе имеется немного информации об отличиях гаплоидных и дигаплоидных растений рапса, хотя по другим видам подобные исследования уже проводились [15–19]. При этом основное внимание уделялось исследованию лишь хлоропластов. Цель нашей работы – выявить различия между гаплоидными и дигаплоидными растениями озимого рапса, полученными через культуру пыльников, на цитологическом и морфологическом уровнях.

Материалы и методы. В качестве материала использовали гаплоидные и дигаплоидные растения озимого рапса (*Brassica napus* L., $2n = 38$), полученные в лаборатории биотехнологии Института масличных культур НААН Украины при культивировании пыльников *in vitro* образцов № 23 и 24 из коллекции ИМК НААН. Для сравнения привлекали также диплоидные растения образцов этой культуры – № 2973 и 24. Пыльники культивировали на питательной среде МС [3] согласно стандартной методике [3, 6]. Регенерированные из гаплоидных тканей растения высаживали в сосуды с легкой почвосмесью, обработав их перед этим 0,05%-ным водным раствором колхицина.

Для подсчета числа хромосом у полученных через культуру *in vitro* растений рапса готовили временные давленные препараты точек роста и оснований молодых листочков. В качестве красителя использовали пропионолактоид [13]. Готовые препараты анализировали с помощью светового микроскопа ЛОМО с иммерсионным объективом при увеличении 900×.

Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и измерение длины замыкающих клеток устьиц проводили на эпидермальной ткани, взятой с нижней стороны апикальной части листа. Использовали наиболее развитые листья с нижней части стебля. Эпидермальную ткань фиксировали в ледяной уксусной кислоте в течение 20 мин, после чего помещали в краситель на 10 мин. В качестве красителя использовали реактив

Люголя (5%-ный раствор йода в йодистом калии) [13]. Затем эпидермальные высечки просматривали под световым микроскопом. По каждому образцу анализировали 150 устьиц. У каждого растения также подсчитывали количество устьиц в 30 полях зрения, которое затем пересчитывали на единицу площади в 1 мм².

Цитологические характеристики гаплоидных и дигаплоидных образцов сравнивали между собой и с соответствующими усредненными показателями диплоидов.

После начала цветения анализировали морфологические характеристики цветков гаплоидных, дигаплоидных и диплоидных растений в десяти повторностях. При этом учитывали такие элементы цветка, как максимальный диаметр, длина и ширина лепестка, а также длина пыльников.

Оценку достоверности различий между сравниваемыми группами растений осуществляли согласно t-критерию Стьюдента [14].

Результаты исследований и их обсуждение. Анализируемая выборка растений получена из эмбриоидов при культивировании пыльников озимого рапса на искусственной питательной среде (рис. 1). Предположительно эту выборку составляли растения двух типов – гаплоиды и спонтанно удвоенные гаплоиды.

Изучаемые растения вначале анализировали на пloidность методом прямого подсчета количества хромосом в соматических клетках. Результаты анализа метафазных пластинок показали, что среди проанализированных образцов рапса были как растения с числом хромосом около 19, так и с увеличенным в два раза числом хромосом (рис. 2), т.е. одна часть растений была гаплоидами, другая – удвоенными гаплоидами. На тех же растениях с разной пloidностью провели подсчет количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (табл. 1).

Установлено, что гаплоидные по числу хромосом образцы характеризовались значительно меньшим количеством хлоропластов по сравнению с удвоенными гаплоидами или диплоидными образцами, которые были взяты для сравнения. Их количество у гаплоидных растений составляло 13–14 на клетку, тогда как у удвоенных гаплоидов – 19–21 (рис. 3).

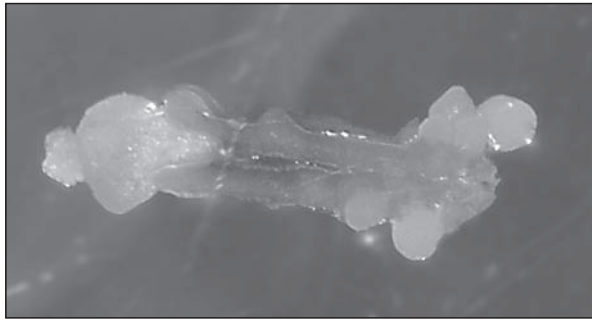


Рис. 1. Индукция *in vitro* гаплоидных структур эмбриоидного типа на пыльниках озимого рапса

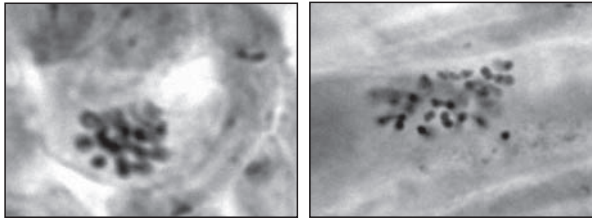


Рис. 2. Метафазные пластинки гаплоидного (слева) и дигаплоидного (справа) образцов озимого рапса



Рис. 3. Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц гаплоидного (слева) и дигаплоидного (справа) образцов озимого рапса

Количество хлоропластов у гаплоидных и дигаплоидных образцов по отношению к диплоидным образцам, которые в данном случае можно рассматривать как контроль, составило 100 % для удвоенных гаплоидов и 63–71 % – для гаплоидных образцов. Таким образом, уменьшение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц гаплоидов составило 29–37 % по сравнению с диплоидами и удвоенными гаплоидами.

Помимо хлоропластов, у андрогенных растений анализировали и длину замыкающих клеток устьиц. Из данных табл. 2 видно, что

размер устьиц гаплоидных растений значительно отличался от диплоидов и удвоенных гаплоидов. Они были почти на треть короче по сравнению с упомянутыми образцами. Длина замыкающих клеток устьиц удвоенных гаплоидов составляла около 90 % от длины у диплоидов.

Еще одним цитологическим критерием, по которому проводили сравнение полученных через культуру пыльников растений, служило количество устьиц на единицу площади. Наибольшее количество устьиц установлено у растений с гаплоидным набором хромосом (табл. 3). Их было почти в полтора раза больше, чем у удвоенных гаплоидов, и более чем в два раза больше, чем у диплоидов. Очевидно, это обусловлено более мелкими раз-

Таблица 1
Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц разных по пloidности образцов озимого рапса

№ образца	Пloidность образцов по числу хромосом	Число хлоропластов, шт.
23	Гаплоид	12,8 ± 0,12
24	Гаплоид	14,4 ± 0,14
23	Удвоенный гаплоид	20,5 ± 0,15
24	Удвоенный гаплоид	19,5 ± 0,16
24	Удвоенный гаплоид	20,9 ± 0,15
24	Диплоид	20,3 ± 0,27
2973	Диплоид	20,9 ± 0,22

Таблица 2
Длина замыкающих клеток устьиц у гаплоидных, дигаплоидных и диплоидных растений озимого рапса

№ образца	Пloidность	Длина замыкающих клеток устьиц, мкм
23	Гаплоид	16,42 ± 0,10*
24	Гаплоид	16,58 ± 0,11*
23	Удвоенный гаплоид	23,83 ± 0,13
24	Удвоенный гаплоид	22,26 ± 0,18
24	Удвоенный гаплоид	23,09 ± 0,14
24	Диплоид	27,06 ± 0,25
2973	Диплоид	26,91 ± 0,23

* Гаплоидные образцы отличаются от дигаплоидных и диплоидных на 0,1%-ном уровне значимости.

мерами эпидермальных и замыкающих клеток гаплоидов по сравнению с диплоидами. Имелись также некоторые различия и между удвоенными гаплоидами и диплоидами. У растений первой группы количество устьиц на 1 мм² было большим (табл. 3).

Различия между растениями разной ploидности исследовали и на морфологическом уровне. Они наблюдались даже визуально — у гаплоидных растений цветки были значительно мельче, хотя по высоте растения не отличались (рис. 4).

Морфология некоторых элементов цветка у растений разной ploидности представлена в табл. 4, из которой видно, что все элементы цветков, сформированных на растениях гаплоидного типа, существенно меньше, чем у удвоенных гаплоидов и диплоидного образца (рис. 5). Диаметр цветка у гаплоидов по сравнению с удвоенными гаплоидами уменьшился в 1,4 раза, длина пыльников — в 1,8 раза, длина и ширина лепестков — в 1,6 раза, при этом различия между удвоенными гаплоидами и диплоидами не выявлены.

Пыльники растений как гаплоидного, так и дигаплоидного типов визуально образовывали достаточно много пыльцы. Однако если у дигаплоидных растений установлено нормальное завязывание семян, то у гаплоид-



Рис. 4. Цветущие побеги гаплоидного (слева) и дигаплоидного (справа) растений озимого рапса



Рис. 5. Стручки гаплоидного (слева) и дигаплоидного (справа) растений озимого рапса

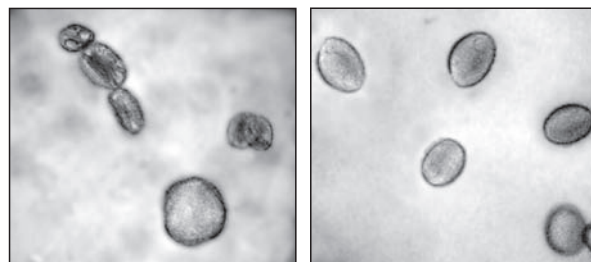


Рис. 6. Пыльцевые зерна гаплоидного (слева) и дигаплоидного (справа) растений озимого рапса

Таблица 3
Количество устьиц у гаплоидных, дигаплоидных и диплоидных растений озимого рапса

№ образца	Плоидность	Количество устьиц на 1 мм ² , шт.	Количество устьиц на 1 мм ² , по отношению к диплоидам
23	Гаплоид	314 ± 24,5	220
24	Гаплоид	243 ± 7,9	170
23	Удвоенный гаплоид	171 ± 4,6	120
24	Удвоенный гаплоид	186 ± 5,6	130
24	Удвоенный гаплоид	186 ± 6,4	130
24	Диплоид	157 ± 3,1	—
2973	Диплоид	129 ± 3,9	—

дов формировались стручки лишь с единичными семенами (рис. 5). Высокая завязываемость семян в первом случае косвенно указывает на нормальное протекание процессов мейоза и микрогаметогенеза и свидетельствует о том, что у таких растений имеется удвоенный набор хромосом ($2n = 38$). Плохая завязываемость семян во втором случае говорит о нарушении микроспорогенеза как следствии гаплоидии (рис. 6).

Морфология цветков растений озимого рапса разного типа плоидности

Растения	Диаметр цветка, мм	Длина лепестка, мм	Ширина лепестка	Длина пыльника
Диплоидные	18,1 ± 0,41	13,0 ± 0,25	6,2 ± 0,23	4,4 ± 0,19
Дигаплоидные	17,2 ± 0,35	12,9 ± 0,38	6,5 ± 0,21	4,0 ± 0,18
Гаплоидные	12,6 ± 0,23*	9,5 ± 0,49*	4,0 ± 0,14*	2,2 ± 0,14*

Примечание. Использованы усредненные значения образцов одной и той же плоидности.* Отличия от дигаплоидов и диплоидов существенны при $P < 0,001$.

При проведении цитологических исследований учитывали анатомические особенности гаплоидов. Известно, в частности, что имеется некоторая изменчивость в размере замыкающих клеток устьиц в пределах листа и в зависимости от возраста листа. В этой связи для измерений мы использовали эпидермальную ткань лишь с определенной части листьев одного возраста. По данным Хохлова и др. [16], различия по размеру клеток у гаплоидов и диплоидов кукурузы выражались в пределах 40 %. В наших исследованиях размер замыкающих клеток устьиц у гаплоидов был меньше на 39 % по сравнению с диплоидами и на 28 % — по сравнению с удвоенными гаплоидами.

Известно, что плоидность растений коррелирует с числом хлоропластов. Такие исследования проводили на различных видах, в том числе на растениях семейства *Brassicaceae*. Так, выявлена тесная связь между количеством хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и уровнем плоидности у капусты полевой (*B. campestris*) [16]. При подсчете числа хлоропластов в клетках губчатой и палисадной паренхимы листа у растений разной плоидности этого же вида также установлена определенная зависимость, хотя и не такая четкая, как в случае замыкающих клеток устьиц, что говорит о влиянии плоидности генома на этот признак в разных типах клеток.

С плоидностью растений могут коррелировать и другие признаки. Так, дифференциацию гаплоидных и дигаплоидных растений проводят и по длине замыкающих клеток устьиц. Например, указанный параметр положительно коррелировал с уровнем плоидности у андрогенных растений перца, хотя, по мнению авторов [16], количество хлоропластов является более надежным критерием.

Это обусловлено тем, что длина замыкающих клеток устьиц варьировала значительно сильнее, чем число хлоропластов. Для выявления гаплоидов возможно использовать также количество замыкающих клеток устьиц на единицу площади листа. По данным Котляровой [19], у гаплоидных растений *Daucus carota* L. этот показатель был на четверть большим, чем у диплоидов.

Выводы. В результате сравнения на цитологическом уровне гаплоидных растений озимого рапса с удвоенными гаплоидами и диплоидами установлено, что они существенно отличались по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, размеру замыкающих клеток устьиц и количеству устьиц на единицу площади. У гаплоидов два первых показателя были почти на треть меньше, а число устьиц в полтора раза больше, чем у удвоенных гаплоидов. Проведенные исследования растений разных типов плоидности выявили их существенные отличия по морфологии цветка. При этом у гаплоидов уменьшался как диаметр цветка и размеры лепестков, так и длина пыльников. Различия по изучаемым характеристикам между удвоенными гаплоидами и диплоидами выявлены не были. Установленные морфометрические особенности, как и цитологические характеристики, позволяют использовать их для быстрой дифференциации гаплоидных и дигаплоидных растений озимого рапса.

A.I. Soroka

Institute of Oilseed Crops of the NAAN of Ukraine

E-mail: oilseed@mail.zp.ua

DIFFERENTIATION OF HAPLOID AND DIGAPLOID RAPE PLANTS AT THE CYTOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL LEVELS

Some cytological and morphological characteristics of haploid and dihaploid plants of winter rape

obtained via anther culture were studied. It was shown that in haploid plants the number of chloroplasts in stomata guard cells and the size of the stomata guard cells themselves were much smaller, and the number of stomata per unit area was greater than in doubled haploids and diploids. Haploids were also characterized by a smaller size of petals and anthers, and in general, a smaller flower compared to dihaploids and diploids.

A.I. Сорока

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ГАПЛОЇДНИХ
І ДИГАПЛОЇДНИХ РОСЛИН РІПАКА
НА ЦИТОЛОГІЧНОМУ
ТА МОРФОЛОГІЧНОМУ РІВНЯХ

Вивчали деякі цитологічні та морфологічні особливості гаплоїдних і дигаплоїдних рослин ріпака озимого, отриманих методом культури пиляків. Встановлено, що у гаплоїдних рослин кількість хлоропластів в замикаючих клітинах продихів і розмір самих замикаючих клітин продихів була значно меншою, а кількість продихів на одиницю площі — більшою, ніж у подвоєних гаплоїдів і диплоїдів. Гаплоїди характеризувалися також меншими розмірами пелюсток і пиляків і, в цілому, квітки у порівнянні з дигаплоїдами і диплоїдами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. *Hu H., Zeng J.Z.* Development of new varieties via anther culture // Handbook of plant cell culture. — New York : Macmillan, 1984. — Vol. 3. — P. 65–90.
2. *Morrison R.A., Evans D.A.* Haploid plants from tissue culture : New plant varieties in a shortened time // Biotechnology. — 1988. — 6. — P. 684–690.
3. *Ницше В., Венцель Г.* Гаплоиды в селекции растений. — М.: Колос, 1980. — 128 с.
4. *Лях В.А., Сорока А.И.* Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними. — Запорожье, 2008. — 182 с.
5. *Ferrie A.* Microspore culture of *Brassica* species // Doubled Haploid Production in Crop Plants : A manual / Eds M. Maluszynski et al. — Dordrecht etc.: Kluwer Acad. Publ., 2003. — P. 205–215.
6. *Шамина З.Б.* Андрогенез и получение гаплоидов в культуре пыльников и микроспор // Культура клеток растений / Под ред. Р.Г. Бутенко. — М.: Наука, 1981. — С. 124–135.
7. *Vyvadilova M., Tomaskova D., Vechyne M., Kucera V.* The use of doubled haploids to stabilize yellow-seedness in oilseed rape (*Brassica napus*) // Czech J. Genet. and Plant Breed. — 1999. — 35, № 1. — P. 7–9.
8. *Ribarits A., Mamun A., Shipeng L., Resch T., Fiers M., Heberle-Bors E., Liu C.-M., Touraev A.* Combination of reversible male sterility and doubled haploid production by targeted inactivation of cytoplasmic glutamine synthetase in developing anthers and pollen // Plant Biotech. J. — 2007. — 5, № 4. — P. 483–494.
9. *Keller W.A., Armstrong K.C.* Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures // Can. J. Bot. — 1977. — 55. — P. 1383–1388.
10. *Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Noellen Y., Dons H.J.M., Van Lookeren Champagne M.M.* Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus* // Plant Cell Rep. — 1994. — 13. — P. 267–271.
11. *Friedt W., Zarhloul M.K.* Haploids in the Improvement of Crucifers // Haploids in Crop Improvement II / Eds C.E. Palmer, W.A. Keller, K.J. Kasha. — Berlin : Springer-Verlag, 2005. — 56. — P. 191–213.
12. *Zhou W.J., Tang G.X., Hagberg P.* Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus* // Plant Growth Regulation. — 2002. — 37, № 2. — P. 185–192.
13. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
14. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1979. — 406 с.
15. *Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. и др.* Гаплоидия и селекция. — М.: Наука, 1976. — 221 с.
16. *Натаока Y., Fujita Y., Iwai S.* Number of chloroplasts in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris* // Plant Tissue Culture Lett. — 1991. — 8, № 2. — P. 67–72.
17. *Qin X., Rotino G.L.* Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1995. — 41, № 2. — P. 145–149.
18. *Давыдова Н.Н.* Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — М., 2008. — 25 с.
19. *Котлярова О.В.* Усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — М., 2010. — 26 с.

Поступила 10.01.12