О ПРОПИОНО-ЛАКМОИДНОМ МЕТОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОМОСОМ ОВОЩНЫХ (НА ПРИМЕРЕ КАПУСТНЫХ КУЛЬТУР)

Кан Людмила Юрьевна*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО)
143072, Россия, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
*Автор для переписки: loyus@mail.ru

Показана универсальность и эффективность испытанного и надёжного пропионо-лакмоидного метода приготовления давленых препаратов корневой и стеблевой меристемы для цитологического исследования хромосом овощных - представителей семейства *Brassicaceae*.
Представлены кариотипы капустных растений.

Цитологические исследования, как неотъемлемая часть селекционного процесса, ведутся в нашем старейшем учреждении на протяжении всего периода его существования. В 30-х годах прошлого столетия в цитологической лаборатории Грибовской овощной селекционной опытной станции старшим научным сотрудником А.А. Кривенко был с успехом освоен ацетокарминовый метод кариологического изучения исходного материала по лукам и чеснокам (Кан, 2023). Этот же метод, достаточно распространённый и в современных цитологических исследованиях, использовали в своей работе старший научный сотрудник лаборатории генетики и цитологии ВНИИССОК И.В. Полумордвинова и научный сотрудник Г.С. Шевченко (Кан, 2024).

На протяжение вот уже двадцати пяти лет в лаборатории генетики и цитологии развиваем цитологические исследования, которые проводим несложным, но довольно эффективным **пропионо-лакмоидным методом** (Соловьева, 1982) путем приготовления давленых препаратов меристемы стебля и кончиков корней овощных растений, в данном случае корешков проростков семян капустных культур. Он отлично зарекомендовал себя при кариологических исследованиях селекционно-генетического материала большинства овощных культур (Домблидес, и др., 2016; Кан, 2018; Домблидес, Кан, и др., 2018; Козарь, и др., 2019; Domblides, E. et al., 2020; Zayachkovskaya, T. et al., 2021).

Автор этого метода С.Г. Каптарь (1967) привёл описание ускоренного способа приготовления и окрашивания временных цитологических препаратов и предложил использовать пропионо-лакмоид (ПЛ), как фиксатор-краситель.

Удобство данного метода заключается в том, что фиксация материала (**в пропионовой кислоте**) и окрашивание (**лакмоидом**) происходит одновременно **в стандартном растворе пропионо-лакмоида*** в течение 24 часов, что положительно влияет на качество приготовления препаратов.

Объекты исследований:
Селекционно-генетические и биотехнологические формы овощных культур - представители родов Brassica L., Raphanus L.

В задачи наших исследований входило:
- прямой подсчёт числа хромосом селекционных образцов овощных (капустных культур);
- установление плоидности биотехнологических растений-регенерантов капусты, редиса, рапса в технологиях получения DH-организмов и полиплоидизации *in vitro;*
- исследование кариотипов видов.

Этапы проведения эксперимента:
Для получения большого числа метафаз весь исследуемый материал проращиваем в лабораторных или тепличных условиях, а именно: луковицы или корневища - в стаканах с водой или во влажном песке (грунте), семена - на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри.

Для фиксации следует брать интенсивно растущие ткани, чтобы обеспечить большое количество делящихся клеток. Предобработку меристемы (**раствором колхицина или α-монобромнафталина**) у капустных культур можно не применять, так как на каждом препарате можно найти удобные для подсчёта метафазные пластинки с сильно укороченными хромосомами.

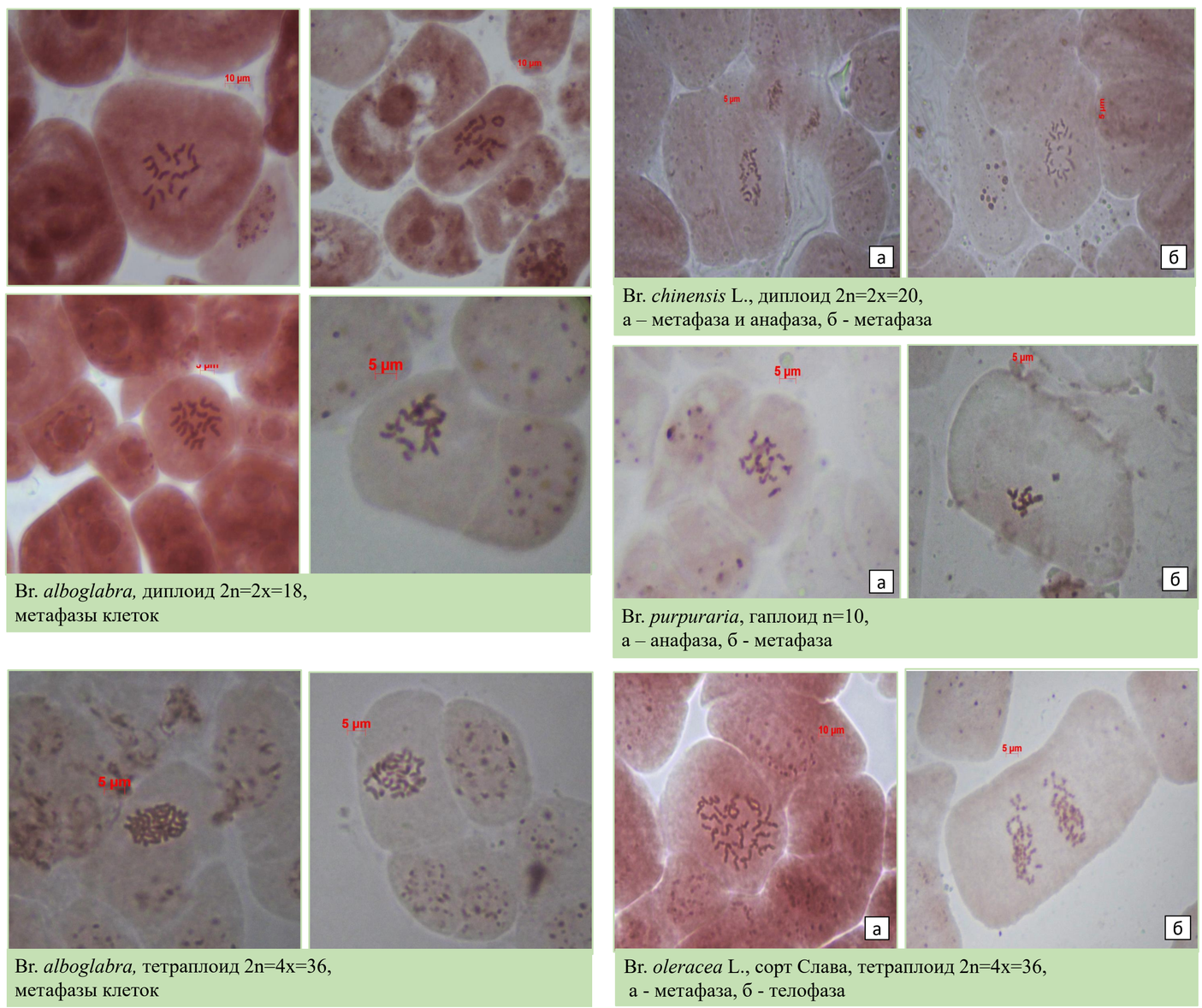
Мацерацию производим путём кипячения окрашенных тканей в термостойкой пробирке над спиртовкой **в 40%-ной пропионовой кислоте**: если это меристема стебля, то кипятим 20-30 с; меристемы крупных корней - 45-60 с; мелких — 20-30 секунд с момента закипания.

Затем даём материалу остыть 1-3 минуты (и больше) и давим на предметном стекле **в капле 40%-ной пропионовой кислоты**. Для этого накрываем покровное стекло 3-5 полосками фильтровальной бумаги, прижав её по краям покровного стекла. Плоским концом деревянной ручки препаровальной иглы, очень сильно надавливая, «проглаживаем» всю поверхность покровного стекла по горизонтали и вертикали. Такой способ уплощения клеток применим для объектов с мелкими хромосомами, каковыми являются хромосомы капустных культур.

Как правило, оплавляем препарат и оставляем для дифференцировки на 30 мин и более.

Препараты просматриваем при объективах 20х, 40х, а подсчёт хромосом, фотографирование или зарисовку — при объективе 100х, с масляной иммерсией. Следует подсчитывать хромосомы в клетках, имеющих цельную, не раздавленную оболочку. В нашем случае препараты просматривали с помощью микроскопа Zeiss Scope.A1, оснащенного камерой Digital Camera Power Shot G10 Canon. Обработку изображений проводили с помощью программы Axio Vision, версия 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

***Приготовление пропионо-лакмоида (ПЛ)**:
5 г лакмоида добавить к 50 мл 50%-ной пропионовой кислоты, поставить в тёмное место на 3-5 дней, периодически встряхивая колбу. ***Не нагревать!*** *Затем профильтровать и хранить в тёмном месте.*



Br. *chinensis* L., диплоид 2n=2x=20, а – метафаза и анафаза, б - метафаза

Br. *alboglabra,* диплоид 2n=2x=18, метафазы клеток

Br. *purpuraria*, гаплоид n=10, а – анафаза, б - метафаза

Br. *alboglabra,* тетраплоид 2n=4x=36, метафазы клеток

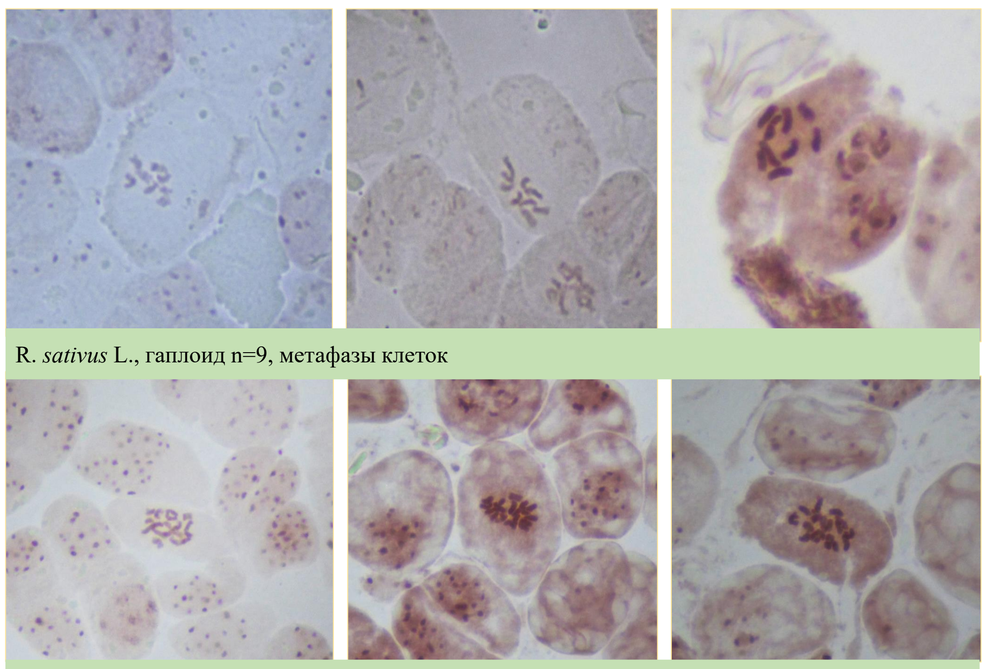
Br. *oleracea* L., сорт Слава, тетраплоид 2n=4x=36, а - метафаза, б - телофаза

Рис. 1. Кариотипы различных видов рода Brassica L.

Общеизвестно, что каждому виду растений, в том числе и овощным, присуща определённая цитологическая характеристика – **кариотип вида** с постоянным числом хромосом, их морфологией и особенностями строения.

Многие овощные культуры (пасленовые, большинство зонтичных, капустных и тыквенных культур) представлены видами с мелкими хромосомами, что порой затрудняет исследования.

Нам удалось, используя именно **пропионо-лакмоидный метод**, получить качественные цитологические препараты метафазных клеток, не смотря на то, что *Капустные* являются трудным мелкохромосомным объектом (относительная длина хромосом от 2 до 5,5 мкм). Были уточнены числа хромосом четырех видов рода Brassica L. (**рис. 1**), а также были исследованы кариотипы биотехнологических образцов редиса, в том числе гаплоидной формы (**рис. 2**).

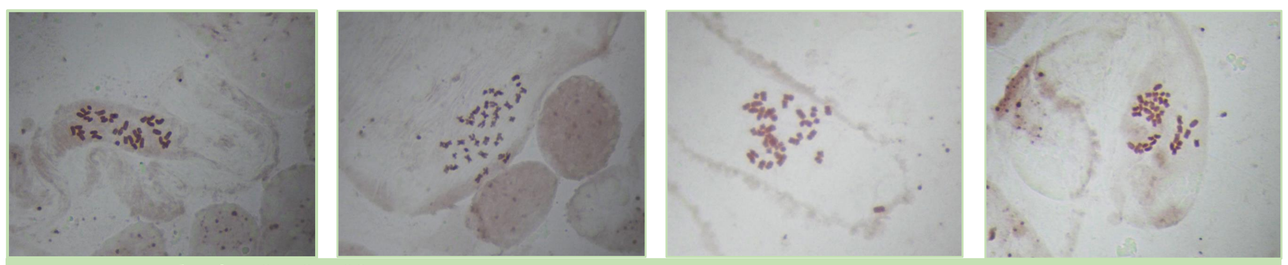


R. *sativus* L., гаплоид n=9, метафазы клеток

R. *sativus* L., диплоид 2n=2x=18, метафазы клеток

Рис. 2. Кариотип вида Raphanus sativus L. Ув. ×2500

На **рис. 3** представлены метафазные пластинки рапса Brassica *napus* var. *olerifera* (2n=2x=38) - естественного амфидиплоида у Brassica, образованного от скрещивания видов Brassica *campestris* (2n=2x=20) и Brassica *oleracea* (2n=2x=18).



Br. *napus* var. *olerifera* 2n=2x=38 метафазы клеток

Рис. 3 Кариотип вида Brassica *napus* var. *olerifera.* Ув. ×2500

Литература

1. Кан Л.Ю. Развитие цитологических исследований на Грибовской овощной селекционной опытной станции // Известия ФНЦО, 2023. doi.org/10.18619/2658-4832-2023-4-56-80.
2. Кан Л.Ю. Развитие цитологических исследований во ВНИИССОК *(Посвящается 90-летию со дня рождения цитолога Ирины Владимировны Полумордвиновой)* // Известия ФНЦО, 2024. doi.org/10.18619/2658-4832-2024-32-40.
3. Соловьёва Л.В. Практикум по цитологии плодовых растений. – М.: Изд-во МГУ,1982. – 54 с.
4. Домблидес Е.А., и др. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные. ФГБНУ «ВНИИССОК». Москва, 2016.
5. Кан Л.Ю. Цитологический анализ селекционно-генетического материала рода *Daucus* L. Вавиловские чтения – 2018: Сборник статей межд. науч.-практ. конф., посвященной 131-ой годовщине со дня рождения академика Н. И. Вавилова. – Саратов: Амирит, 2018. – С. 59-63.
6. Домблидес Е.А., Кан Л.Ю., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес А.С. Цитологическая оценка удвоенных гаплоидов кабачка (CUCURBITA PEPO L.). Овощи России. 2018;(6):6-9.
7. Козарь Е.В., Коротцева К.С., Романова О.В., Чичварина О.А., **Кан Л.Ю.**, Ахраменко В.А., Домблидес Е.А. Получение удвоенных гаплоидов *Brassica purpuraria* **Овощи России. 2019, (6):3-7. DOI:10.18619/2072-9146-2019-6-3-7**
8. E. Domblides, N. Shmykova, G. Khimich, I. Korotseva, **L.Kan**, A. Domblides, V. Pivovarov, A. Soldatenko. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture in vitro**. Acta Hortic. 1294. ISHS 2020. DOI 10.17660/ActaHortic.2020.1294.4**
9. Zayachkovskaya, T. et al. Production of Gynogenetic Plants of Red Beet (Beta *vulgaris* L.) in Unpollinated Ovule Culture *in Vitro. Plants 2021,10,2703.* https://doi.org/10.3390/plants10122703
10. Каптарь С. Г. Ускоренный пропионо-лакмоидный метод приготовления и окрашивания временных цитологических препаратов для подсчёта хромосом у растений // Цитология и генетика, 1967. Т.1, № 4. – С.87-90.