

ассоциированных с апомиксисом, методом Саузерн гибридизации на основе рестриктаз BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI и PstI. Эксперименты по детекции геномных локусов апомиксиса у генотипа с апомиктическим размножением позволили выявить следующие маркеры. При гибридизации с пробой 1 детектируется PstI фрагмент размером около 2 Kb. При гибридизации с пробой 2 детектируются Eco130I фрагменты размером около 1 и 6 Kb, HindIII фрагменты – около 1.5 и 6 Kb, MvaI фрагменты – около 1 и 8 Kb. При гибридизации с пробой 3 детектируется PstI фрагмент размером около 4 Kb.

К сожалению, выделить гены апомиксиса пока не удалось ни в одной лаборатории, ведущей исследования в этой области. В перспективе выполнение настоящего проекта позволит идентифицировать геномные локусы, ассоциированные с гаметофитным апомиксисом. Полученные нами результаты позволяют надеяться на успех в идентификации геномных локусов, вовлеченных в генетический контроль апомиксиса, при скрининге на больших выборках коллекционного материала.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-97039 p_поволжье_a и № 13-04-01404-a).

1. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic Control of Gametophytic Apomixis: Current Status of Knowledge// Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. 2004. Section B. V. 58. No. 5/6. P. 167 – 174.

2. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants// Annu. Rev. Genet. 2007. V. 41. P. 509 – 537.

3. Rodriguez-Leal D. and Vielle-Calzada J.-P. Regulation of apomixis: learning from sexual experience// Curr. Opin. Plant Biol. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/>

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛОИДНОСТИ ТОМАТОВ

Глушен С. В.¹, Павлова И. В.², Коломиец О. О.^{1,2}, Белокурская Е. Н.¹

¹ Белорусский государственный университет, Минск

albarut@yandex.by

² РУП «Институт овощеводства», Минск

hakuroshya@yahoo.com

В последнее время клональное микроразмножение получает все большее распространение в Республике Беларусь для целого ряда сельскохозяйственных, декоративных и лесообразующих растений. В РУП “Институт овощеводства” этот метод применяется для получения селекционно ценных линий томата (*Lycopersicum esculentum*) и других овощных культур. При этом используются разработанные в НАН Беларуси методические приемы, позволяющие с высокой частотой индуцировать развитие андрогенетических растений-регенерантов из микроспор на

средней и поздней стадии после освобождения из тетрад [1]. Одним из условий успешного применения технологии клонального микроразмножения является достоверное определение уровня пloidности регенеранта. Этот этап необходим для того, чтобы отобрать для дальнейшей работы индуцированные гаплоиды и спонтанно возникшие дигаплоиды.

Существует ряд прямых и непрямых методов определения пloidности у растений. Непрямые методы основаны на сопоставлении генотипов исходного растения и регенеранта по морфологии (высота, размеры листьев, особенности цветка), мощности и фертильности, числу хлоропластов и их размерам в замыкающих клетках устьиц [2]. Эти методы не отличаются надежностью, поскольку в значительной степени отражают физиологическое состояние растения и поэтому подвержены влиянию среды, однако они не требуют сложного и дорогого оборудования. Прямые методы определения пloidности растений более надежны, они включают широко известные цитологические методики, такие как подсчет числа хромосом в клетках апекса корневого чехлика и измерение содержания ДНК в изолированных клетках с помощью проточной цитометрии [4]. Последний метод считается наиболее перспективным, обеспечивая анализ большого количества образцов, получаемых в ходе культивирования *in vitro*. Он также позволяет детектировать миксопloidные растения-регенеранты и определять их частоту встречаемости в материале. Однако этот метод является и наиболее дорогостоящим.

Целью нашего исследования была разработка нового метода определения пloidности растений томата, сочетающего в себе положительные качества как прямых, так и непрямых методов – точность, надежность, производительность и невысокую стоимость. Методической основой данной разработки являлся флуоресцентный микроскоп Eclipse 50i, снабженный телекамерой DS-5Mc (Nikon). Для компьютерного анализа полученных изображений использовали программу ImageJ.

Уровень пloidности контрольных растений и регенерантов определяли путем окраски хромосом ацетофуксином после обработки клеток монобромнафталином [3]). Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц проводили с помощью флуоресцентного микроскопа, возбуждая флуоресценцию хлорофилла ультрафиолетом. Клеточные ядра из ткани листа выделяли согласно методикам, применяемым в проточной цитометрии [6]. Относительное содержание ДНК в клетках определяли при помощи флуорохрома – бромида этидия с последующим измерением интегральной яркости изображений изолированных клеточных ядер. Для избирательной окраски замыкающих клеток устьиц использовали флуорохром DIOC₆ [5].

Сравнительное исследование различных методов определения плоидности растений томата показало, что наиболее перспективным для применения в технологии культивирования *in vitro* в селекционном процессе овощных культур ~~—микрочлонального размножения~~ может быть метод, основанный на морфометрии устьиц листа. Решающее значение в этом методе имеет специфическая окраска оболочек замыкающих клеток флуорохромом DIOC₆ после спиртовой фиксации. Результаты проведенных измерений показывают, что морфометрические параметры этих клеток у диплоидного контроля и гаплоидных растений-регенерантов четко различаются между собой:

Таблица – Морфометрические параметры устьиц

Параметр	Контроль	Регенеранты	<i>t-критерий</i>
Длина, мкм	54,12 ± 3,78	18,36 ± 1, 31	8,93*
Ширина, мкм	23,60 ± 1,68	10,53 ± 0,83	6,97*
Плотность расположения, %	2,4 ± 2,2	6,5 ± 0,5	1,82

*достоверно при $p < 0,01$

В отличие от других непрямых методов предлагаемый нами способ определения плоидности практически не зависит от физиологического состояния растения, а затрачиваемое на его проведение время сопоставимо с таковым у более сложного и дорогостоящего прямого метода, основанного на измерении относительного количества ДНК. Производительность метода может быть значительно увеличена путем разработки специализированного программного обеспечения, позволяющего обрабатывать полученные изображения клеток в автоматическом режиме.

1. А.с. №1554368. Способ получения дигаплоидов картофеля *Solanum tuberosum* L. / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова – зарег. 1.12.1989.
2. Иванова С. В., Долгодворова Л. И., Карцов М. В. Морфометрическая и цитогенетическая характеристика гаплоидов томата // Генетика, 2000, Т. 36, № 1. С. 52-61.
3. Паушев З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1970. 254 с.
4. Galbraith D. W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future //Biomedica 2010. Vol 30 (Supl.). P. 65-70.
5. Fotopoulos V., De Tullio M., Barnes J., Kanellis A. K. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signaling // J. Exp. Botany 2008. Vol. 59, № 4. P. 729-737.
6. Loureiro J., Rodriguez E., Dolezel J., Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species //Annals of Botany 2007. Vol. 100. P. 875–888.