

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У ТЕТРАПЛОИДА ЯБЛОНИ И ЕГО РОДИТЕЛЬСКОЙ ФОРМЫ В СВЯЗИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В СЕЛЕКЦИИ НА ПОЛИПЛОИДНОМ УРОВНЕ

Наталья Геннадьевна Лавруевич, кандидат сельскохозяйственных наук

Анастасия Геннадьевна Бородкина, младший научный сотрудник

Мария Александровна Зубкова, младший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур,

д. Жилина, Орловская обл., Россия

E-mail: lavrusevich@orel.vniispk.ru

Аннотация. Метод, дающий наибольший эффект для создания сортов яблони с тройным набором хромосом, которые превосходят по своим характеристикам диплоидные сорта, — гибридизация диплоидных сортов ($2x$) с тетраплоидами ($4x$). Набор исходных форм (тетраплоиды) для селекции, обладающих ценными признаками (зимостойкость, высокое качество плодов, устойчивость к болезням и другое) лимитирован. Результативность работ по получению новых ценных сортов яблони, на основе метода полиплоидии, во многом зависит от их разнообразия. Следовательно, выделение тетраплоидов и их цитологическое исследование для определения качества формируемых гамет — обязательное условие при селекции по созданию ценных триплоидных генотипов. Изучали микроспорогенез у двух гибридов с тетраплоидным набором хромосом. Готовили временные давленные препараты ацетогематоксилиновым методом. Для подсчета хромосом в соматических клетках гибридных растений применяли метод Каптаря (1967). Окрашивали материал раствором лакмоида и пропионовой кислоты. Анализ хода мейоза у тетраплоида яблони 34-21-39 [30-47-88($4x$) $\times$ Краса Свердловска($2x$)] и ее родительской формы 30-47-88 [Либурти($2x$) $\times$ 13-6-106 ($4x$)] показал, что наиболее правильным ходом мейоза отличается гибрид 34-21-39. Наибольший процент отклонений и разнообразие мейотических аномалий выявлено у формы 30-47-88. Микроспорогенез завершается формированием визуально нормальной одномерной пыльцы — 89% (форма 34-21-39) и 50% (30-47-88). В комбинациях скрещиваний, с участием изученных форм, найдено 83,1% триплоидов. Для обеспечения большего получения триплоидов можно рекомендовать для гибридизации тетраплоиды 34-21-39 и 30-47-88.

Ключевые слова: *Malus domestica*, полиплоидия, мейоз, донор диплоидных гамет, триплоидные генотипы, плоидность

CHARACTERISTICS OF MICROSPOROGENESIS IN THE TRIPLOID APPLE TREE AND IT'S PARENTAL FORM IN CONNECTION WITH USAGE IN BREEDING AT THE POLYPLOID LEVEL

N.G. Lavrusevich, PhD in Agricultural Sciences

A.G. Borodkina, Junior Researcher

M.A. Zubkova, Junior Researcher

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Zhilin village, Oryol region, Russia

E-mail: lavrusevich@orel.vniispk.ru

Abstract. An effective method of creating triploid apple cultivars, which are superior in their characteristics to diploid cultivars, is the crossing of heterochromosomal forms of the type: $2x \times 4x$, $4x \times 2x$. In order to provide a wide range of genetic diversity of triploid hybrids, it is necessary to have a large set of tetraploid donor forms of diploid gametes. A limited set of such forms is a limiting factor for this direction of breeding. And the effectiveness of work on obtaining new valuable apple varieties based on the use of the polyploidy method largely depends on their diversity. Therefore, the identification of new apple tetraploids, as well as the study of cytoembryological features of their generative structures, the determination of the quality of the formed gametes necessary for successful breeding and for predicting the results of these works are relevant. Meiosis during microsporogenesis was studied in two tetraploid apple forms. To study meiosis during microsporogenesis, temporary pressed specimen were prepared by the acetohematoxylin method; the propionic-lacmoid method was used to determine the ploidy of hybrid offspring. Microscopic studies were carried out on a Nikon-50i microscope at a magnification of $10 \times 105 \times 40$, $10 \times 1.5 \times 100$. The analysis of the course of meiosis during microsporogenesis in apple tetraploid 34-21-39 [30-47-88($4x$) $\times$ Krasa Sverdlovskaya($2x$)] and its parent form 30-47-88 [Liberty $\times$ 13-6-106 (Suvorovetz seedling)] showed that the hybrid 34-21-39 was characterized by the most correct course of meiosis. The largest percentage of deviations and the diversity of morphological types of disorders were detected in the form 30-47-88. Common types of violations were noted. Despite the presence of disorders during meiosis in tetraploid forms, microsporogenesis ended with the formation of visually normal one-dimensional pollen: 89% in the form 34-21-39 and 50% in the form 30-47-88. In combinations of crosses involving the studied forms, a high yield of triploid plants was noted. Consequently, the tetraploid apple forms 34-21-39 and 30-47-88 can be recommended for hybridization for the purpose of mass production of triploid seedlings. The results allow us to conclude that the tetraploid apple forms 34-21-39 and 30-47-88 can be used in breeding as pollinators in heteroploid crosses ($2x \times 4x$) to obtain triploid genotypes.

Keywords: *Malus domestica*, polyploidy, meiosis, donor of diploid gametes, triploid genotypes, ploidy

Яблоня — ведущая плодовая культура в стране. Для пополнения стандартного сортимента необходимы новые высокоадаптивные, иммунные, устойчивые, урожайные сорта яблони с высоким товарным и потребительским качеством плодов.

Полиплоидия — основная движущая сила в эволюции как диких, так и культурных растений. Полиплоидные организмы часто проявляют повышенный потенциал и в некоторых случаях превосходят своих диплоидных родственников в некоторых аспектах. [14] Доля полиплоидных видов покрытосеменных растений составляет не менее 50%. [2, 4] По мнению А.А. Жученко, преимущество полиплоидных видов растений, проявляющееся в их широком географическом распространении, состоит не только в возможностях онтогенетической адаптации, но и в достижении большей генетической (видовая, экотипическая, биогенетическая) изменчивости, обеспечивающей лучшую экологическую специализацию особенностями функционирования систем филогенетической адаптации. [1, 6] Распространенная форма спонтанной полиплоидии — образование полиплоидов с помощью нередуцированных гамет. Примером возникновения полиплоидов путем формирования нередуцированных гамет в естественных условиях считаются триплоидные сорта яблони, такие как *Болдуин*, *Боскопская красавица*, *Графенштейнское*. Спонтанные триплоиды, полученные от скрещивания двух диплоидных сортов — *Витязь*, *Рождественское*, *Юбилар*, *Низкорослое*. [8]

Использование метода полиплоидии для создания сортов с $3x$ генотипом — приоритетное направление в селекционных программах ВНИИ селекции плодовых культур. [9, 10] Триплоидия у яблони — наименьший уровень полиплоидии, который дает наибольший хозяйственный эффект. Получены триплоидные сорта от целенаправленных разноросомосомных скрещиваний, характеризующиеся регулярным плодоношением, хорошей товарностью плодов, высокой самоплодностью. [11, 13]

Эффективный прием для разработки триплоидного потомства — скрещивания форм разной пloidности типа $2x \times 4x$, $4x \times 2x$. [8] Для этого необходимы тетраплоидные формы (доноры диплоидных гамет). Сами тетраплоиды не пригодны для практического использования из-за низкой зимостойкости, сла-

бой урожайности, но они ценны для селекции. [12] Зарубежные ученые отмечают устойчивость тетраплоидов к стрессам, фитофторозу, парше. [15, 16]

Применяя тетраплоиды в гетероплоидных скрещиваниях, учитывают особенности формирования гамет. Эти знания позволяют селекционерам правильно подобрать исходные формы и наметить объем скрещиваний, чтобы создать гибридный фонд полиплоидов для выделения в дальнейшем из них форм-кандидатов в сорта с триплоидным генотипом.

Цель работы — изучение микроспорогенеза у тетраплоидов яблони и возможности использования их в качестве исходных форм в селекции с применением полиплоидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в лаборатории цитозембриологии Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (ВНИИСПК). Микроспорогенез изучали у двух тетраплоидных форм яблони: 34-21-39 и 30-47-88, которые получены в лаборатории селекции яблони ВНИИСПК.

Форма 34-21-39 выделена в гибридном потомстве от скрещивания тетраплоидной формы 30-47-88 в качестве материнского родителя и диплоидного сорта *Краса Свердловска* (отцовский компонент). Родительская форма 30-47-88 (*Либерти* $\times$ 13-6-106) обладает геном иммунитета к парше V_f ($Rvi6$).

Цитологические исследования проводили по общепринятым методикам. Временные давленные препараты приготавливали ацетогематоксилиновым методом. [5, 7]

Брали для исследования (фиксировали) генеративные почки с момента появления стадии зеленого конуса. При обнаружении в окрашенных пыльниках стадии профазы фиксировали ежедневно до завершения мейоза. Фиксатор — уксусный спирт (три части 96% этилового спирта и одна ледяной уксусной кислоты). Материал промывали 96% этиловым спиртом, заливали 70% этиловым спиртом для хранения.

Чтобы определить пloidность гибридного потомства яблони от гетероплоидных скрещиваний применяли пропионово-лактоидный метод. [3, 5]

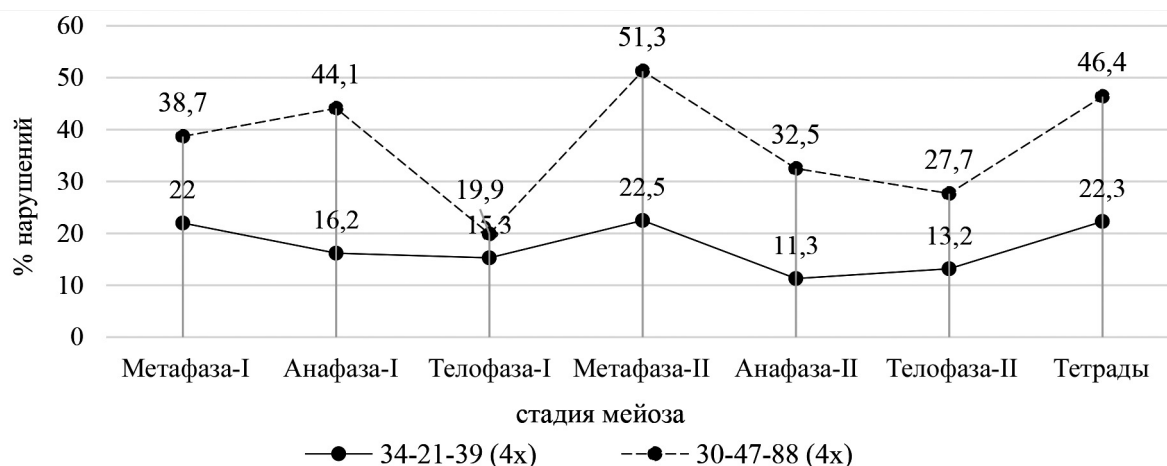


Рис. 1 Характеристика микроспорогенеза у тетраплоидных форм яблони.

Таблица 1.

Морфология нарушений в ходе мейоза у тетраплоидных форм яблони

Стадия мейоза	Тетраплоидная форма яблони	
	34-21-39	30-47-88
	тип нарушения	
Метафаза-I	Забегание, выбросы	Забегание, выбросы, диффузное распределение хромосом, микроверетено, комбинация из двух типов нарушений
Анафаза-I	Отставание, выбросы, мост	Отставание, выбросы, мост, сверхчисленные веретена, комбинация из двух типов нарушений
Телофаза-I	Микроядра	Микроядра
Метафаза-II	Забегание, выбросы, комбинация из двух типов	Забегание, выбросы, сверхчисленные веретена, неравные веретена деления, асинхронность деления, дегенерация хроматина, отсутствие хроматина, диффузное распределение хроматина, комбинация из двух типов нарушений
Анафаза-II	Отставание, выбросы, мост	Отставание, выбросы, сверхчисленные веретена, мост, асинхронность деления, комбинация из двух типов нарушений
Телофаза-II	Сверхчисленные ядра, микроядра	Сверхчисленные ядра, микроядра, асинхронность деления, дегенерация хроматина
Тетрады	Пентады, гексады, гептады	Пентады, гексады, гептады

Микроскопические исследования осуществляли на микроскопе «Nikon-50i» при увеличении 10x1,5x40, 10x1,5x100. Фотографии сделаны фотокамерой Nikon DS-Fi 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ микроспорогенеза у тетраплоидной формы яблони 34-21-39 и ее материнской формы 30-47-88 показал, что наиболее правильным ходом мейоза отличался гибрид 34-21-39, по сравнению с родительской. Число нарушений у него меньше, и микроспороциты с нормальной картиной деления составляют на разных стадиях от 77,5 до 88,7%. Наибольший процент отклонений у формы 30-47-88 – 19,9 (телофаза-I)...51,3% (метафаза-II), в зависимости от стадии микроспо-

рогенеза. Больше всего нарушений у одной и другой отмечено на стадии метафаза-II (рис. 1).

Количество мейотических аномалий и их морфологическое разнообразие взаимосвязаны между собой. Чем правильнее течение редукционного деления, тем меньше разнообразие отклонений в нем, например, у формы 34-21-39 (4х). Наоборот, у тетраплоида 30-47-88 наибольший процент аномалий в ходе мейоза и разнообразие морфологических типов нарушений больше (табл. 1).

Для тетраплоидных форм 34-21-39 и 30-47-88 общие типы нарушений на стадиях метафаза-I и метафаза-II – выбросы и преждевременное забегание хромосом до начала анафазного движения в основной группе (рис. 2 а, в). На стадиях анафаза-I и анафаза-II наблюдаются отставания (рис. 2б), мосты и выбросы хромосом, приводящие в даль-

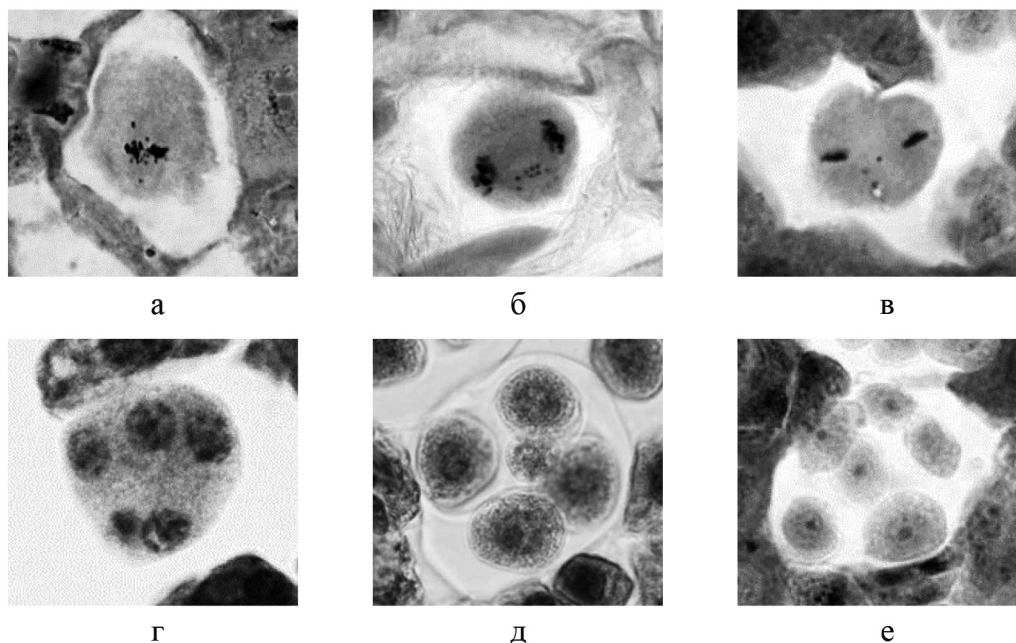


Рис. 2. Аномальное деление в ходе микроспорогенеза: а – метафаза-I, забегание хромосом, 30-47-88; б – анафаза-I, отставание хромосом, 30-47-88 (4х); в – метафаза-II, выбросы хромосом, 30-47-88; г – телофаза-II сверхчисленные ядра 34-21-39; д – пентада, 34-21-39; е – гексада, 30-47-88.

Таблица 2.

Плоидность гибридного потомства

Гибридная семья	Количество семян, шт.	В том числе, шт./%	
		диплоиды	триплоиды
Гирлянда (2х)×34-21-39 (4х)	160	32/20	128/80
Созвездие (2х) ×30-47-88(4х)	250	54/21,6	196/78,4
Гирлянда (2х) ×30-47-88 (4х)	330	73/22,1	257/77,9
Приокское ×30-47-88 (4х)	208	59/24,4	149/71,6
Краса Свердловска ×30-47-88 (4х)	77	13/16,9	64/83,1

нейшем к формированию сверхчисленных фигур деления и, как следствие этого, образование дополнительных ядер и микроядер на стадиях телофаза-I и телофаза-II и сверхчисленных микроспор на стадии тетрад (рис. 2 г-е). У изученных форм полиады представлены пентадами, гексадами, гептадами (рис. 2 д, е). Количество аномальных тетрад у гибридной формы 34-21-39 составляет 22,3%, родительской формы 30-47-88 — 46,4%.

Несмотря на наличие нарушений в ходе мейоза у изученных тетраплоидных форм микроспорогенез завершается формированием достаточного количества визуально нормальной одномерной пыльцы — 89% (форма 34-21-39) и 50% (30-47-88).

Данные характеристики мейоза подтверждаются результатами анализа плоидности гибридного потомства, полученного с участием этих форм (табл. 2).

Во всех комбинациях скрещиваний отмечен большой процент растений с триплоидным генотипом: 80% — с тетраплоидной формой 34-21-39, 71,6...83,1% — 30-47-88. Следовательно, тетраплоидные формы яблони 34-21-39 и 30-47-88 можно рекомендовать для включения в селекцию на полиплоидном уровне с целью массового получения триплоидных семян.

Выводы. Тетраплоидные формы яблони 34-21-39 и 30-47-88 могут быть включены в селекционную работу в качестве опылителей в гетероплоидных скрещиваниях (2х × 4х) для получения триплоидных генотипов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (экологические основы). М.: РУДН, 2001. Т. I. 780 с.
- Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агросферы (теория и практика). М.: Агрорус, 2004. Т. I. 690 с.
- Каптарь С.Г. Ускоренный пропионово-лактоидный метод приготовления и окрашивания временных цитологических препаратов для подсчета хромосом у растений // Цитология и генетика. 1967. Т. I. № 4. С. 87–90.
- Парфенов В.И., Дмитриева С.А. Роль полиплоидии в эволюции растений в условиях умеренного климата и равнинного рельефа (на примере флоры Белоруссии) // Известия АН БССР. сер. биол. наук. 1991. № 3. С. 39.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.
- Першина Л.А. О роли отдаленной гибридизации и полиплоидии в эволюции растений // Информационный вестник ВОГИС. 2009. Т. 13. № 2. С. 336–344.

- Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова и Т.П. Огольцовой. Орел: ВНИИСПК, 1999. 608 с.
- Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. Орел: ВНИИСПК, 2011. 624 с.
- Седов Е.Н., Седышева Г.А., Красова Н.Г. и др. Достоинства и перспективы новых триплоидных сортов яблони для производства // Садоводство и виноградарство. 2017. № 2. С. 24–30.
- Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008. 368 с.
- Седов Е.Н., Янчук Т.В., Корнеева С.А. Новые диплоидные, триплоидные, иммунные к парше и колонновидные сорта яблони в совершенствовании сортимента // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2022. № 1. С. 25–31. DOI: 10.30850/vrsn/2022/1/25-31
- Седов Е.Н., Янчук Т.В., Корнеева С.А. Ценные доноры диплоидных гамет для создания триплоидных сортов яблони // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2020. № 3. С. 13–17. DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/13-17
- Янчук Т.В., Седов Е.Н., Корнеева С.А., Вепринцева М.В. Тургеневское и тренер Петров — новые триплоидные сорта яблони селекции ВНИИСПК // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2022. № 6. С. 66–69. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/6/66-69
- Sattler M.C., Carvalho C.R., Clarindo W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding // Planta. 2016. Vol. 243. PP. 281–296. DOI: 10.1007/s00425-015-2450-x
- Švara A., Ilnikar K., Carpentier S. et al. Polyploidy affects the development of Venturia inaequalis in scab-resistant and -susceptible apple cultivars // Scientia Horticulturae. 2021. 290 p. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110436
- Wójcik D., Marat M., Marasek-Ciofakowska A. et al. Apple Autotetraploids — Phenotypic Characterisation and Response to Drought Stress // Agronomy. 2022 Vol. 12. 161 p. DOI: 10.3390/agronomy12010161

REFERENCES

- Zhuchenko A.A. Adaptivnaya sistema selekcii rastenij (ekologicheskie osnovy). M.: RUDN, 2001. T. I. 780 s.
- Zhuchenko A.A. Ekologicheskaya genetika kul'turnykh rastenij i problemy agrosfery (teoriya i praktika). M.: Agrorus, 2004. T. I. 690 s.
- Kaptar' S.G. Uskorennyj propionovo-lakmoidnyj metod prigotovleniya i okrashivaniya vremennykh citologicheskikh preparatov dlya podscheta hromosom u rastenij // Citologiya i genetika. 1967. T. I. № 4. S. 87–90.
- Parfenov V.I., Dmitrieva S.A. Rol' poliploidii v evolyucii rastenij v usloviyah umerennogo klimata i ravninnogo rel'efa (na primere flory Belorussii) // Izvestiya AN BSSR. ser. biol. nauk. 1991. № 3. S. 39.

5. Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij. Moskva: Kolos, 1980. 304 s.
6. Pershina L.A. O roli otдалennoj gibridizacii i poliploidii v volyucii rastenij // Informacionnyj vestnik VOGIS. 2009. T. 13. № 2. S. 336–344.
7. Sedov E.N. Selekcija i novye sorta yablони. Orel: VNIISPK, 2011. 624 s.
8. Sedov E.N., Sedysheva G.A., Krasova N.G. i dr. Dostoinstva i perspektivy novyh triploidnyh sortov yablони dlya proizvodstva // Sadovodstvo i vinogradarstvo. 2017. № 2. S. 24–30.
9. Sedov E.N., Sedysheva G.A., Serova Z.M. Selekcija yablони na poliploidnom urovne. Orel: VNIISPK, 2008. 368 s.
10. Sedov E.N., Yanchuk T.V., Korneeva S.A. Novye diploidnye, triploidnye, immunnye k parshe i kolonovidnye sorta yablони v sovershenstvovanii sortimenta // Vestnik Rossijskoj sel'skoxozyajstvennoj nauki. 2022. № 1. S. 25–31. DOI: 10.30850/vrsn/2022/1/25-31
11. Sedov E.N., Yanchuk T.V., Korneeva S.A. Cennye donory diploidnyh gamet dlya sozdaniya triploidnyh sortov yablони // Vestnik Rossijskoj sel'skoxozyajstvennoj nauki. 2020. № 3. S. 13–17. DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/13-17
12. Programma i metodika sortoizucheniya plodovyh, yagodnyh i orekhoplodnyh kul'tur/ Pod red. E.N. Sedova i T.P. Ogor'covej. Orel: VNIISPK, 1999. 608 s.
13. Yanchuk T.V., Sedov E.N., Korneeva S.A., Veprinceva M.V. Turgenevskoe i trener Petrov – novye triploidnye sorta yablони selekcii VNIISPK // Vestnik Rossijskoj sel'skoxozyajstvennoj nauki. 2022. № 6. S. 66–69. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/6/66-69
14. Sattler M.C., Carvalho C.R., Clarindo W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding // Planta. 2016. № 2432. P. 281–296. DOI: 10.1007/s00425-015-2450-x
15. Švara A., Ilnikar K., Carpentier S. et al. Polyploidy affects the development of Venturia inaequalis in scab-resistant and -susceptible apple cultivars // Scientia Horticulturae. 2021. 290 p. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110436
16. Wójcik D., Marat M., Marasek-Ciołakowska A et al. Apple Autotetraploids – Phenotypic Characterisation and Response to Drought Stress // Agronomy. 2022. Vol. 12. 161 p. DOI: 10.3390/agronomy12010161

Поступила в редакцию 23.11.2023

Принята к публикации 07.12.2023