


ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У ТЕТРАПЛОИДНОЙ ФОРМЫ ЯБЛОНИ № 141

М.А. Зубкова , м.н.с.

О.Н. Улицкая, м.н.с.

А.Г. Бородкина

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, klimenko@vniispk.ru

Аннотация

Одним из приоритетных направлений селекции является полиплоидный метод. Его использование позволит создать большой гибридный фонд триплоидов яблони, обладающих высокими хозяйственно-ценными признаками: адаптивностью, высокой урожайностью и товарностью плодов, регулярным плодоношением, устойчивостью к основным болезням и вредителям. Проводимая селекционная работа по интервалентным скрещиваниям привела к получению тетраплоидов. Для определения их селекционной значимости актуально изучение их генеративной сферы, что в свою очередь, позволит определить необходимый объем скрещиваний с целью прогнозирования предполагаемых результатов. Изучен микроспорогенез у тетраплоидной формы яблони №141 [25-37-45 (Орловская гирлянда × Уэлси тетраплоидный) × Афродита]. Отмечено наличие нарушений при формировании микроспор. Отмечены следующие типы нарушений: забегания групп хромосом и отдельных хромосом к полюсам веретена деления, отставания хромосом, выбросы отдельных хромосом в цитоплазму микроспороцита, забегание и выбросы, отставание и выбросы, мосты между анафазными группами, отмечено наличие сверхчисленных веретен деления, наличие микроядер. На стадии тетрад формируются полиады (пентады, гексады). Нарушения наблюдаются на всех стадиях деления и составляют от 10,81 до 25,41%, что говорит об относительной правильности хода протекания мейоза. Это приводит к формированию достаточно высокого количества визуально нормальной диплоидной пыльцы. Изученная фертильность пыльцы составила 63,25%. На основании полученных данных, можно рекомендовать тетраплоидную форму яблони № 141 (4x) для использования в селекции на полиплоидном уровне в качестве отцовского компонента при гетероплоидных скрещиваниях.

Ключевые слова: уровень плоидности; полиплоидия; мейоз; цитология; яблоня; микроспорогенез; тетраплоид; селекция

STUDY OF MICROSPOROGENESIS FEATURES IN TETRAPLOID OF APPLE № 141

M.A. Zubkova , junior researcher

O.N. Ulitskaya, junior researcher

A.G. Borodkina

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, klimenko@vniispk.ru

Abstract

One of the priority areas of selection is the polyploid method. Its use will create a large hybrid fund of apple triploids with high economically valuable traits: adaptability, high yield and marketability of fruit, regular fruiting, and resistance to main diseases and pests. The ongoing breeding work on intervalent crosses led to the production of tetraploids. To determine their breeding significance, it is necessary to study the state of the generative sphere, which, in turn, will allow us to determine the necessary volume of crosses in order to predict the expected results. Microsporogenesis was studied in the apple tetraploid № 141 [25-37-45 (Orlovskaya Girlianda × Wealthy tetraploid) × Afrodita]. The presence of disturbances in the formation of microspores was noted. The following types of abnormalities were noted: the movement of groups of chromosomes and individual chromosomes to the poles of the fission spindle, lag of chromosomes, ejections of individual chromosomes into the cytoplasm of the microsporocyte, displacement and ejections, lag and ejections, bridges between anaphase groups, the presence of supernumerary fission spindles, the presence of micronuclei. At the stage of tetrads, polyads (pentads, hexads) are formed. Violations are observed at all stages of division and range from 10.81 to 25.41%, which indicates the relative correctness of the course of meiosis. Therefore, this leads to the formation of a sufficiently high amount of visually normal diploid pollen. The studied pollen fertility was 63.25%. Based on the data obtained, the tetraploid form of apple tetraploid № 141 (4x) can be recommended for use in breeding studies at the polyploid level as a paternal component in heteroploid crosses.

Key words: ploidy; polyploidy; meiosis; cytology; apple tree; microsporogenesis; tetraploid; breeding

Введение

В настоящее время во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции плодовых культур (ВНИИСПК; г. Орел) проводится селекция яблони на полиплоидном уровне под руководством академика РАН Седова Е.Н. Одним из перспективных методов совершенствования форм рода *Malus* является метод полиплоидии, который позволяет получить триплоидные сорта яблони, обладающие важными хозяйственно ценными признаками, высокой устойчивостью и адаптивностью, что приводит к постоянному улучшению стандартного сортимента (Бученков и др., 2005; Седов и др., 2017; Седов, 2017; Седов и др., 2017; Седов и др., 2018; Седов и др., 2008; Седышева и др., 2013; Седышева и др., 2017).

Основной проблемой, затрудняющей практическое использование полиплоидов в качестве исходных форм для гибридизации, являются нарушения в их генеративной

сфере, приводящие к низкой плодовитости. Исследования микроспорогенеза дает информацию о различных нарушениях в процессах образования и формирования пыльцы у исследуемых форм яблони.

Во ВНИИСПК работа по селекции яблони на полиплоидном уровне проводится в комплексе с лабораторией селекции яблони под руководством академика Е.Н. Седова. Цель работы: Изучение микроспорогенеза тетраплоидной формы яблони № 141. Задачи: 1) изучение хода течения мейоза и определение фертильности пыльцевых зерен; 2) охарактеризовать данную форму для использования в гетероплоидных скрещиваниях в качестве отцовского компонента.

Биологическим объектом исследований является тетраплоидная форма яблони № 141 [25-37-45 (Орловская гирлянда × Уэлси тетраплоидный) × Афродита], полученная в лаборатории селекции яблони ВНИИСПК.

Материалы и методика проведения исследований

Мейоз при микроспорогенезе изучали на временных давленных препаратах, приготовленных ацетогематоксилиновым методом (Топильская и др., 1975). Фиксацию бутонов проводили на протяжении нескольких дней с момента появления зеленого конуса и до распускания цветка. В качестве фиксирующей жидкости использовали уксусный алкоголь (3:1) – 3 части 96% этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты.

Определение фертильности пыльцевых зерен проводилось методом окрашивания ацетокармином (Паушева, 1980).

Исследования проводили на микроскопах «Nikon-50i» и «Nikon-80i». Фотографии сделаны фотокамерой Nikon DS-Fi 1.

Результаты и их обсуждение

При изучении стадий мейоза отмечено следующее: процент нарушений при формировании микроспор, который встречается на всех стадиях (таблица 1), не превышает 25,41% (Анафаза – II), что является относительно низким показателем (Горбачева, 2019). Наибольшее количество нарушений отмечено на стадиях метафаза I и анафаза II – 21,88% и 25,41% соответственно.

Таблица 1 – Характеристика хода мейоза у тетраплоидного гибрида № 141 [25-37-45 (Орловская гирлянда × Уэлси тетраплоидный) × Афродита]

Стадии мейоза	Всего изучено клеток	В том числе				±m
		нормальных		С нарушением		
		шт.	%	шт.	%	
Метафаза – I	96	75	78,13	21	21,88	4,22
Анафаза – I	164	140	85,37	24	14,63	2,76
Телофаза – I	111	99	89,19	12	10,81	2,95
Метафаза – II	121	100	82,64	21	17,36	3,44
Анафаза – II	185	138	74,59	47	25,41	3,20
Телофаза – II	210	180	85,71	30	14,29	2,41
Тетрады	452	397	87,83	55	12,17	1,54

Отмечены следующие типы нарушений хода мейоза:

1. Забегание групп хромосом и отдельных хромосом к полюсам веретена деления, которые встречаются на стадиях M–I (рисунок 1а) и M–II, что составляет 57,14% и 42,86% соответственно от общего количества микроспороцитов с нарушением (таблица 2).

2. Отставание хромосом в А-I (рисунок 1б) и А-II (70,83% и 29,79% соответственно).
3. Выбросы отдельных хромосом в цитоплазму микроспороцита: на стадии М-I составляет 42,86%, на стадии М-II – 47,62%, на стадии А-I – 20,83%, на стадии А-II – 34,04%.
4. Забегание и выбросы на стадии М-II встречались в 9,52% случаев.
5. Отставание и выбросы зафиксированы в А-II – 27,66% (рисунок 1в).
6. Мосты между анафазными группами: А-I – 8,33%, А-II – 4,25%.
7. Наличие сверхчисленных веретен деления в А-II – 4,25%.
8. Наличие микроядер (рисунок 1г). На стадиях Т-I и Т-II данный тип нарушений является единственным. Формируется, помимо четырех основных, еще 1...3 микроядрышка. На стадии Т-I количество таких микроспороцитов составляет 10,81%, а на стадии Т-II – 14,29%.
9. Отмечено формирование полиад на стадии тетрад (пентады – 52,73% (рисунок 1д), гексады 47,27%).

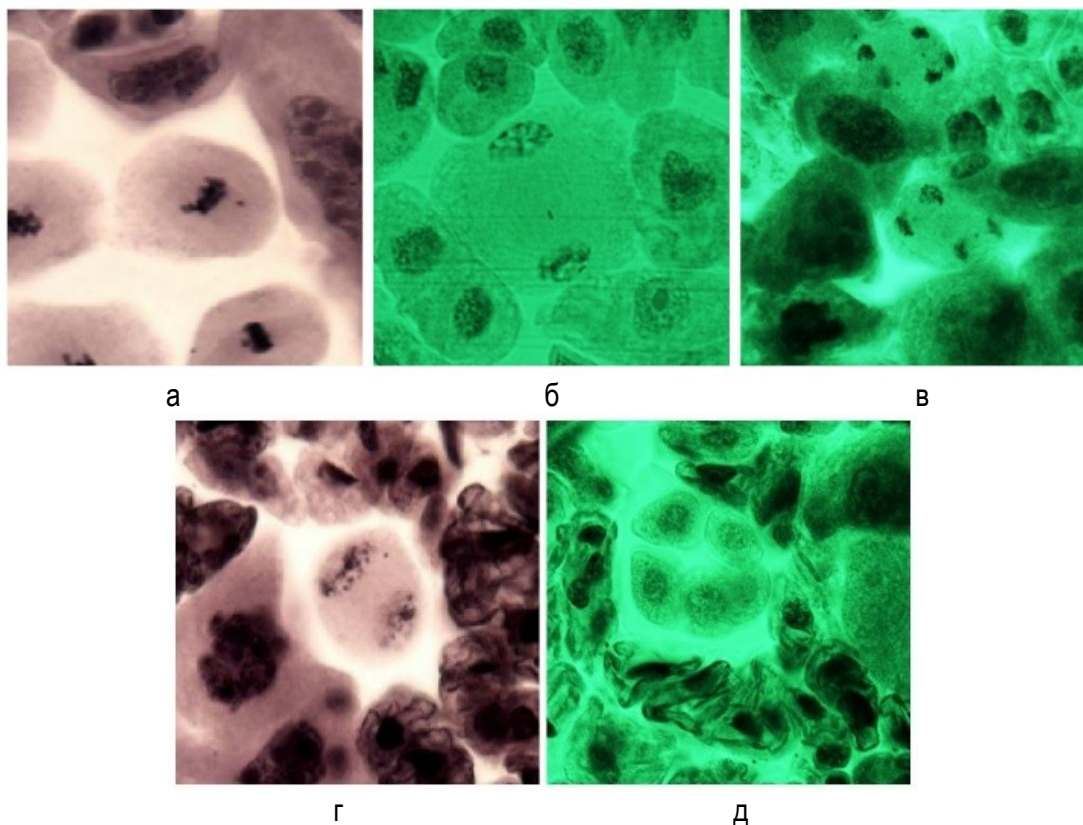
Таблица 2 – Морфология нарушений в ходе мейоза у тетраплоидной формы № 141 [25-37-45 (Орловская гирлянда × Уэлси тетраплоидный) × Афродита]

Стадии мейоза	Морфология нарушений	Количество нарушений	% от общего числа нарушений
Метафаза - I	забегания	12	57,14
	выбросы	9	42,86
Анафаза - I	отставания	17	70,83
	выбросы	5	20,83
	мост	2	8,33
Телофаза - I	микроядра	12	100,00
Метафаза - II	забегания	9	42,86
	выбросы	10	47,62
	забегания и выбросы	2	9,52
Анафаза- II	отставания	14	29,79
	выбросы	16	34,04
	отставания и выбросы	13	27,66
	3 веретена	2	4,25
	мост	2	4,25
Телофаза- II	микроядра (1-3)	30	100,00
Тетрады	пентады	29	52,73
	гексады	26	47,27

Таким образом, в М-II наиболее часто встречающимся типом нарушений является выброс хромосом за пределы ахроматинового веретена, который сопровождается формированием 1-3 микроядер во время телофазы-II. В дальнейшем, на стадии тетрад наличие микроядер может приводить к формированию микроспор с микроядрами или спорад с увеличенным, относительно нормы, числом микроядер в микроспороците. В данном случае, лучше у формы №141 формировались пентады и гексады.

Тетракинез у тетраплоидной формы яблони № 141 (4х) в 87,83% случаях завершается формированием правильных тетрад.

Нормальные фертильные пыльцевые зерна составляют 63,25%.



а – М-I – забегание хромосомы; б – А-I – отставание хромосомы; в – А-II – отставания и выбросы хромосом; г – Т-I – микроядро; д – стадия тетрад – пентада

Рисунок 1 – Виды нарушений в ходе микроспорогенеза у тетраплоидной формы яблони №141 ($4x=68$)

Следовательно, на основании цитологических исследований можно сделать вывод о пригодности данной формы яблони в качестве донора диплоидных гамет и, следовательно, для использования в селекции на полиплоидном уровне (Седов и др., 2008).

Выводы

Получены новые сведения о генеративной структуре исходной формы яблони на пригодность для использования в селекции на полиплоидном уровне.

Изучен мейоз при микроспорогенезе у тетраплоидной формы яблони № 141 [25-37-45 (Орловская гирлянда × Уэлси тетраплоидный) × Афродита].

Полученные данные позволяют сделать вывод, что данная форма может использоваться в селекции на полиплоидном уровне в качестве донора диплоидных гамет.

Литература

1. Бученков И.Э., Кавцевич В.Н., Бавтуто Г.А. Создание исходного материала плодоваягодных культур на основе полиплоидии // Агрэкология. Экологические основы плодощовощеводства: сб. науч. тр., вып. 2. Горки, 2005. С. 17-20.
2. Горбачева Н.Г., Клименко М.А. Цитологический контроль гибридных сеянцев, исходных форм яблони на полиплоидном уровне // Современное садоводство - Contemporary horticulture. 2019. № 1. С. 25-31. DOI: <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10103>
3. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.

4. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Красова Н.Г., Серова З.М., Янчук Т.В. Достоинства и перспективы новых триплоидных сортов яблони для производства // Садоводство и виноградарство. 2017. № 2. С. 24-30. DOI: <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2017.2.5441>
5. Седов Е.Н. Хозяйственно-биологическая характеристика принципиально новых летних триплоидных сортов яблони с иммунитетом к парше // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2017. № 3. С. 27-30.
6. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Янчук Т.В. Иммунные к парше, триплоидные и колонновидные сорта яблони ВНИИСПК и перспективы селекции // Плодоводство и ягодоводство России. 2017. Т. 48, № 1. С. 226-231.
7. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Янчук Т.В. Интервалентные скрещивания – основной путь создания триплоидных сортов яблони // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. № 3. С. 6-10.
8. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008. 368 с.
9. Седышева Г.А., Седов Е.Н., Горбачева Н.Г., Серова З.М., Ожерельева З.Е. Новый донор селекционно значимых признаков для создания триплоидных, адаптивных, высококачественных сортов яблони // Садоводство и виноградарство. 2013. № 1. С. 13-18.
10. Седышева Г.А., Седов Е.Н., Горбачева Н.Г., Серова З.М., Мельник С.А. Эффективность гетероплоидных скрещиваний в роде *Malus* Mill. и цитологический контроль при создании триплоидных сортов // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2017. №1. С. 6-11. DOI: <https://doi.org/10.24411/2218-5275-2017-00002>
11. Топильская Л.А., Лучникова С.В., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацето-гематоксилиновых давленных препаратах // Бюллетень ЦГЛ им. И. В. Мичурина. 1975. Вып. 22. С. 58-61.

References

1. Buchenkov, I.E., Kavtsevich, V.N., & Bavtuto, G.A. (2005). The creation of the initial material of fruit-berry crops with polyploidy using. In *Agroecology. Ecological principles of fruit and vegetable growing* (Vol. 2, pp 17-20). Gorki. (In Russian).
2. Gorbacheva, N.G., & Klimenko, M.A. (2019). Cytological control of hybrid seedlings and origin genotypes of apple in breeding with polyploidy using. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 1, 25-31. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10103> (In Russian, English abstract)
3. Pausheva, Z. P. (1980). *Practicum on plant Cytology*. (In Russian).
4. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Krasova, N.G., Serova, Z.M., & Yanchuk, T.V. (2017). Advantages and prospects of new triploid apple varieties for production. *Horticulture and viticulture*, 2, 24-30. <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2017.2.5441>. (In Russian, English abstract).
5. Sedov, E.N. (2017). Economical and biological characteristics of fundamentally new summer triploid apple varieties having immunity to scab. *Bulletin of Michurinsk state agrarian university*, 3, 27-30. (In Russian, English abstract).
6. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Serova, Z.M., & Yanchuk, T.V. (2017). Scab immune, triploid and columnar apple varieties bred at ARRIFCB and breeding prospects. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 48(1), 226–231. (In Russian, English abstract).
7. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Serova, Z.M., & Yanchuk, T.V. (2018). Intervalent crossing is the main way to create triploid apple varieties. *Russian agricultural science*, 3, 6-10. (In Russian, English abstract).

8. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., & Serova, Z.M. (2008). *Apple breeding on a polyploidy level*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
9. Sedysheva, G.A., Sedov, E.N., Gorbacheva, N.G., Serova, Z.M., & Ozherelieva, Z.E. (2013). A new donor of selectively significant features for the creation of triploid, adaptive, high-quality apple varieties. *Horticulture and viticulture*, 1, 13-18. (In Russian, English abstract).
10. Sedysheva, G.A., Sedov, E.N., Gorbacheva, N.G., Serova, Z.M., & Melnik, S.A. (2017). The efficiency of heteroploid crossings in *Malus Mill.* and cytological control in the development of triploid varieties. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 1, 6-11. <https://doi.org/10.24411/2218-5275-2017-00002> (In Russian, English abstract).
11. Topilskaya, L.A., Luchnikova, S.V., & Chuvashina, N.P. (1975). Study of currant somatic and meiotic chromosomes on acetohematoxylin squash preparations. *Bulleten I.V. Michurin CGL*, 22, 58-61. (In Russian).