

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ГИБРИДНЫХ СЕЯНЦЕВ, ИСХОДНЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ В СЕЛЕКЦИИ НА ПОЛИПЛОИДНОМ УРОВНЕ

Н.Г. Горбачева , к.с.-х.н.

М.А. Клименко, м.н.с.

*ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район
ВНИИСПК, gorbacheva@vniispk.ru*

Аннотация

Селекция яблони на полиплоидном уровне является перспективным направлением, позволяющим при использовании ее наряду с другими, традиционными методами значительно расширить возможности получения новых сортов с высокой адаптационной способностью и большим биологическим потенциалом, пригодных для возделывания в садах интенсивного типа. Для получения триплоидных сортов необходимы тетраплоидные формы – доноры диплоидных гамет. Имея большое разнообразие тетраплоидных исходных форм для интервалентных скрещиваний, можно рассчитывать на массовое получение триплоидных гибридов с широким размахом изменчивости, а, следовательно, и на большую вероятность отбора сортов яблони на триплоидном уровне с комплексом полезных свойств, отвечающих требованиям интенсивного садоводства. Селекция яблони на полиплоидном уровне невозможна без проведения цитологического контроля, как на этапе подбора и создания исходных форм, так и на этапе оценки полученных в результате гибридизации полиплоидных сортов и гибридов. Проведен цитологический контроль гибридного потомства. Изучен анализ микроспорогенеза у тетраплоидной формы яблони. Анализ пloidности гибридных сеянцев яблони от разнохромосомных скрещиваний в количестве 200 растений из трех гибридных семей показал, что в среднем по всем комбинациям скрещивания 85,0% растений оказались триплоидными с $2n=3x=51$ хромосома и 15,0% – диплоидными с $2n=2x=34$ хромосомы. Изучен мейоз при микроспорогенезе у формы 34-21-39 (4x) [30-47-88 [Либерти×13-6-106 (с.с. Суворовец)] (4x)×Краса Свердловска (2x)]. Полученные данные позволяют сделать вывод, что тетраплоидная форма яблони 34-21-39 (4x) может использоваться в селекционной работе в качестве опылителя.

Ключевые слова: полиплоидия, цитоэмбриология, яблоня, мейоз микроспорогенез, пloidность

CYTOLOGICAL CONTROL OF HYBRID SEEDLINGS AND ORIGIN GENOTYPES OF APPLE IN BREEDING WITH POLYPLOIDY USING

N.G. Gorbacheva , cand. agr. sci.

M.A. Klimenko, junior researcher

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

Abstract

Apple breeding with polyploidy using is a promising direction that allows along with other traditional methods to significantly expand the possibility of obtaining new varieties with high adaptive capacity and great biological potential suitable for cultivation in intensive gardens. Tetraploids as donors of diploid gametes are necessary for obtaining triploid varieties. Having a wide diversity of tetraploid initial genotypes for intervalent crosses, we can count on mass production of triploid hybrids with a wide range of variability, and therefore, a high probability of selection of apple varieties at the triploid level with a set of useful properties that meet the requirements of intensive gardening. Apple breeding at the polyploid level is impossible without cytological control both at the stage of selection and creation of initial forms and at the stage of evaluation of polyploid varieties and hybrids obtained as a result of hybridization. The cytological control of hybrid offspring has been conducted. The analysis of microsporogenesis in tetraploid apples has been studied. The ploidy of hybrid apple seedlings from different chromosomal crosses in the amount of 200 plants from three hybrid families was analyzed: on average, 85.0% of plants were triploid with $2n=3x=51$ chromosomes and 15.0% – diploid with $2n=2x=34$ chromosomes for all combinations of crossing. The meiosis at microsporogenesis was studied in form 34-21-39 (4x) [30-47-88 [Liberty × 13-6-106 (s.s. Suvorovetz)] (4x) × Krasa Sverdlovska (2x)]. The obtained data give the possibility to conclude that apple tetraploid 34-21-39 (4x) may be used in breeding as a pollinator.

Key words: polyploidy, cytoembryology, apple, meiosis, microsporogenesis, ploidy

Введение

Полиплоидия является одним из источников изменчивости, увеличения пластичности форм и их адаптивных возможностей. Использование полиплоидов в селекции яблони позволяет расширить потенциал изменчивости гибридного потомства и увеличить возможность отбора хозяйственно-полезных форм, отличающихся высокой адаптивностью.

Одним из приоритетных направлений селекции яблони в ВНИИСПК является селекция на полиплоидном уровне для создания триплоидных сортов яблони с высокими хозяйственно-ценными признаками. Триплоидные сорта отличаются от диплоидных меньшей периодичностью плодоношения по годам, более высокой товарностью и массой плодов (Бученков и др., 2005; Седов и др., 2015; Седов и др., 2017; Седов, 2017; Седов и др., 2017). Для получения триплоидного гибридного потомства наиболее эффективными являются скрещивания типа $2x \times 4x$, $4x \times 2x$ (Седов и др., 2018; Седов и др., 2008; Седышева и др., 2017). Так как тетраплоидные формы являются промежуточным звеном в создании сортов яблони с тройным набором хромосом, то изучение состояния генеративной сферы

имеет важное значение при оценке их, как доноров диплоидных гамет в селекции на полиплоидном уровне. Ограниченный набор таких форм является лимитирующим фактором для этого направления селекции. Поэтому выделение новых тетраплоидных форм яблони, изучение цитозембриологических особенностей их генеративных структур, качества гамет, цитологический контроль плоидности гибридного потомства необходимы для успешной постановки селекционных работ и для прогнозирования результатов этих работ, является актуальным.

Цель работы: На основе цитозембриологического анализа состояния генеративной сферы дать оценку тетраплоидным формам яблони – донорам диплоидных гамет как исходным формам при получении триплоидных генотипов с повышенным адаптивным потенциалом и высококачественными плодами. В задачи лаборатории цитозембриологии входит: цитологический анализ (определение плоидности) гибридного потомства от разнохромосомных скрещиваний; изучение генеративных структур и качества гамет у исходных форм яблони, определение пригодности этих форм для использования в селекции на полиплоидном уровне.

Объектами исследований являлись гибридные сеянцы яблони полученные от скрещиваний типа $2x \times 4x$ и тетраплоидная форма яблони 34-21-39 [30-47-88 [Либерти \times 13-6-106 (с.с. Суворовец)] (4x) \times Краса Свердловска (2x)], полученные в лаборатории селекции яблони ВНИИСПК.

Работа по селекции яблони на полиплоидном уровне проводится в комплексе с лабораторией селекции яблони под руководством академика Е.Н. Седова.

Материалы и методика проведения исследований

Для цитологического анализа плоидности гибридного потомства яблони использовался пропионово-лактоидный метод (Каптарь, 1967). Прямой подсчет числа хромосом осуществлялся на временных давленных препаратах, приготовленных из меристем и молодых листочков точек роста.

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 спирт (3:1) – 3 части 96% этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты.

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

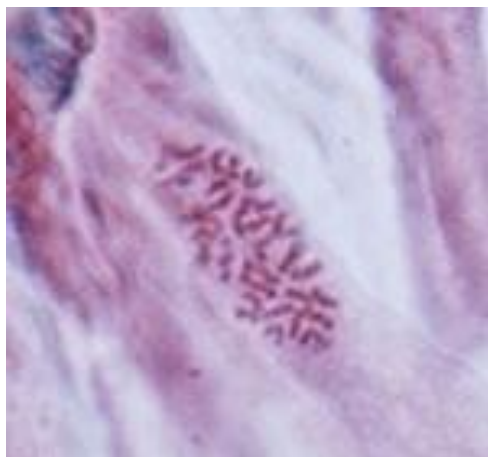
Результаты исследований и их обсуждение

1. Определение плоидности

Проведен анализ плоидности гибридных сеянцев яблони от разнохромосомных скрещиваний в количестве 200 растений из 3-х семей. В изученных семьях в качестве тетраплоидного компонента использовалась форма 30-47-88 (4x). Ранее изученный анализ микроспорогенеза и качества пыльцы у этой форм определили возможность использовать ее в качестве донора диплоидных гамет в селекции на полиплоидном уровне (Седышева и др., 2013). С использованием этой формы в качестве отцовского родителя в гибридных семьях 6414 [Приокское (2x) \times 30-47-88 (4x)], 6420 [Имрус (2x) \times 30-47-88 (4x)], 6388 [Гирлянда (2x) \times 30-47-88 (4x)] в среднем по всем комбинациям скрещивания 170 растений (85,0%) оказались триплоидными с $2n=3x=51$ хромосома, 30 (15,0%) – диплоидными с $2n=2x=34$ хромосомы (таблица 1, рисунок 1). Анализ плоидности гибридных сеянцев яблони показал высокий выход триплоидных растений во всех изученных семьях.

Таблица 1 – Пloidность гибридных семян яблони в селекционной школке

| Инвентарный номер семьи | Название семьи | Всего растений, шт. | В том числе: | | Ошибка выборочной доли sp |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------|----------|---------------------------|
| | | | 3x шт./% | 2x шт./% | |
| 6414 | Приокское (2x) × 30-47-88 (4x) | 49 | 47/95,9 | 2/4,1 | 0,09 |
| 6420 | Имрус (2x) × 30-47-88 (4x) | 72 | 68/94,4 | 4/5,6 | 0,09 |
| 6388 | Гирлянда (2x) × 30-47-88 (4x) | 79 | 55/69,6 | 24/30,4 | 0,05 |
| Всего | | 200 | 170/85,0 | 30/15,0 | 0,03 |



а

б

а – диплоидный набор хромосом ($2n=2x=34$); б – триплоидный набор хромосом ($2n=3x=51$)
Рисунок 1 – Подсчет хромосом в соматических клетках гибридных семян яблони (семья 6420 Имрус (2x) × 30-47-88 (4x))

Из трех семей наименьший выход триплоидных семян в гибридном потомстве выявлен в комбинации скрещивания Гирлянда (2x) × 30-47-88 (4x) – 69,6%. Возможно в данном случае на выходе триплоидов сказывается влияние диплоидного компонента – материнской формы сорта Гирлянда.

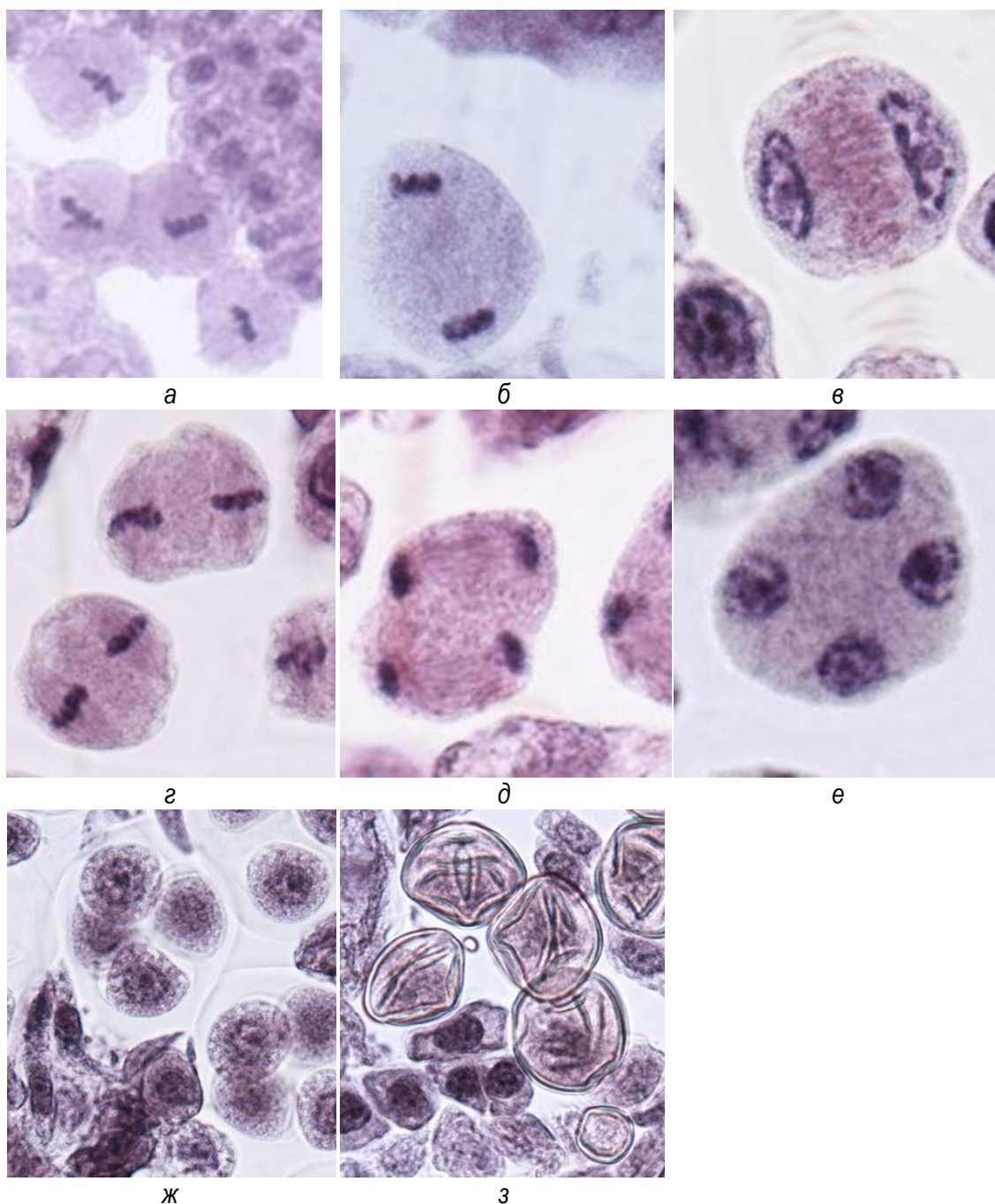
2. Микроспорогенез

Изучен мейоз при микроспорогенезе у тетраплоидной формы яблони 34-21-39 [30-47-88 [Либерти×13-6-106 (с.с. Суворовец)] (4x)×Краса Свердловска (2x)].

У большей части микроспороцитов картины мейотического деления правильные (рисунок 2).

Спектр нарушений небольшой, число типов нарушений на разных стадиях составляет от 1 до 3.

Морфология нарушений у формы 34-21-39 типична, как и для других изученных ранее тетраплоидных форм яблони. Отмечены забегания и отставания хромосом, выбросы отдельных хромосом в цитоплазму микроспороцита, мосты между анафазными группами. Стадия тетрад характеризуется наличием полиад (22,3% спорад становятся полиадами). Отмечено формирование пентад, гексад, реже гептад (рисунок 3). Наличие полиад свидетельствует о нарушении числового распределения хромосом по анафазным группам, и гаметы, сформировавшиеся в полиаде, будут не сбалансированные по числу хромосом. Тетрагенез у формы 34-21-39 (4x) завершается формированием правильных тетрад в 77,7% случаев. Нормальные одномерные пыльцевые зерна составляют 89,5%, на долю аномальной (мелкой и крупной) пыльцы приходится 10,5%.



а – метафаза-I, б – анафаза-I, в – телофаза-I, г – метафаза-II,
д – анафаза-II, е – телофаза-II, ж – тетрады, з – пыльца.

Рисунок 2 – Правильные картины деления в микроспорах тетраплоидной формы яблони 34-21-39 (4x)

Выводы

Полученные данные позволяют сделать вывод о пригодности тетраплоидной формы яблони 34-21-39 (4x) [30-47-88 [Либерти × 13-6-106 (с.с. Суворовец)] (4x) × Краса Свердловска (2x)] в качестве опылителя для использования в селекции на полиплоидном уровне.

Анализ плоидности гибридных сеянцев яблони с использованием тетраплоидной формы 30-47-88 (4x) показал высокий выход триплоидных растений в изученных семьях.

Литература

1. Бученков И.Э., Кавцевич В.Н., Бавтуто Г.А. Создание исходного материала плодово-ягодных культур на основе полиплоидии // *Агрэкология. Экологические основы плодовоовощеводства: сб. науч. тр., вып. 2. Горки, 2005. С. 17-20.*
2. Каптарь С.Г. Ускоренный пропионово-лактоидный метод приготовления и окрашивания временных цитологических препаратов для подсчета хромосом у растений // *Цитология и генетика, 1967. Т. 1, № 4. С. 87-90.*
3. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Макаркина М.А., Левгерова Н.С., Серова З.М., Корнеева С.А., Горбачева Н.Г., Салина Е.С., Янчук Т.В., Пикунова А.В., Ожерельева З.Е. Инновации в изменении генома яблони. Новые перспективы в селекции. Орел: ВНИИСПК, 2015. 336 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. <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. <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., & Bavguto, 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* (issue 2, pp. 17-20). Gorki. (In Russian).
2. Kaptar, S.G. (1967). A faster propionic-lactoid method of preparing and staining temporary cytological specimens for plant chromosome counts. *Cytology and genetics*, 1(4), 87-90. (In Russian).
3. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Makarkina, M.A., Levgerova, N.S., Serova, Z.M., Korneyeva, S.A., Gorbacheva, N.G., Salina, E.S., Yanchuk, T.V., Pikunova, A.V., & Ozherelieva, Z.E. (2015). The

- innovations in apple genome modification opening new prospects in breeding. Orel: VNIISPK. (In Russian. English abstract and conclusion).
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 & 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. Retrieved from <http://journal.vniispk.ru/pdf/2017/1/2.pdf> DOI: 10.24411/2218-5275-2017-00002 (In Russian, English abstract).
 11. Topil'skaya, 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).