

УДК 581.4581.331.2:631.527.5:634.23

Возможность применения морфологических характеристик пыльцы видов и межвидовых гибридов вишни для их геномной идентификации

The possibility of using of morphological characteristics of cherry species and interspecific hybrids pollen for their genomic identification

Мочалова О. В.

Mochalova O. V.

Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко, Змеиногорский тракт, 49, Барнаул, 656045, Россия. E-mail: niilisavenko1@yandex.ru

The M. A. Lisavenko Research Institute of horticulture for Siberia, Zmeinogorskii tract, 49, Barnaul, 656045, Russia

Реферат. В статье обсуждается возможность применения морфологических признаков строения пыльцы и их количества в качестве маркеров для идентификации участия разных отдаленных видовых геномов в формировании сортов и гибридов алтайского генофонда вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall.), находящихся в коллекции НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко. Выявлено, что признаки среднего размера пыльцы и среднего количества многоапертурной пыльцы позволяют отличить гибриды от генетически чистых природных форм вишни степной, идентифицировать гексаплоидные генотипы в тетраплоидной гибридной популяции.

Summary. Possibility of using of the pollen structure morphological characters and their number as markers for identification of participation of different remote species genomes in the formation of varieties and hybrids of the Altai steppe cherry gene fund, located in the collection of The M. A. Lisavenko Institute of Horticulture for Siberia, is discussed in this article. It was revealed that the feature of the average pollen size and ones of average amount of multi-aperture pollen make possible to distinguish hybrids from genetically pure steppe cherry forms and to identify hexaploid genotypes within the tetraploid hybrid population.

Отдаленная межвидовая гибридизация является основным методом создания генетического разнообразия в роде косточковых растений *Prunus* L. для выведения новых сортов с улучшенными хозяйственно ценными признаками. В генетических коллекциях межвидовые гибриды очень часто получают от свободного опыления материнских форм пыльцой неизвестного генетического происхождения. В таком случае у ценных гибридов возникает необходимость геномной идентификации, восстановления видового соответствия исходного отцовского родителя.

Род *Prunus* L. очень сложен в генетическом происхождении. Принято считать, что все виды вишен, имеющие 32 хромосомы, являются в филогенетическом разрезе аллополиплоидами, полученными от межпопуляционных скрещиваний дикорастущих диплоидных таксонов. Так, вишня степная (*P. fruticosa* Pall.) – самый зимостойкий вид, по предположению российских авторов, является результатом слияния нередуцированной гаметы вишни седеющей (*P. canescens* Bois.) с диплоидной гаметой одного из исходных видов подрода *Padellus* Vass. (Еремин, 1985; Симагин, 1997). В свою очередь, нормальная редуцированная гамета вишни степной после соединения с нередуцированной гаметой черешни (*P. avium* L.), по всей видимости, дала жизнь самому востребованному и распространенному европейскому культивному виду *P. cerasus* L. (Olden, Nybon, 1968; Юшев, 1993).

Вишня степная, как и ее тетраплоидные гибриды с вишней обыкновенной, составляют основу культурного ассортимента для территорий Поволжья, Урала и Западной Сибири (Субботин, 2002). На Алтае в межвидовые скрещивания для получения крупноплодных, иммунных к грибным заболеваниям и адаптивных к суровому климату сортов, помимо вишни обыкновенной, была вовлечена тетраплоидная дальневосточная вишня Маака (*P. maakii* Rupr.). Их трехвидовые гибриды, так называемые «церападусы», уже в третьем – четвертом поколениях показывают наличие целого комплекса ценных признаков, включая богатый набор в плодах биологически активных соединений (Субботин, 2002).

Идентификация соотношения геномов разных видов в полученных гибридах и сортах традиционно проводится по совокупности морфологических признаков вегетативных и генеративных орга-

нов. Проявление некоторых внешних маркерных видовых характеристик или промежуточное выражение морфологического признака обычно являются критерием, по которому выявляется «гибридность» полученного генома. Иногда в качестве дополнительных методов привлекаются результаты анатомических и биохимических исследований (Соколова, 1999). В настоящее время наиболее точные результаты о происхождении растительного генома могут быть получены путем изучения молекулярных маркеров (Soltis D.E., Soltis P.S., 1993), однако, для рода *Prunus* такие исследования являются крайне редкими и трудоёмкими. На наш взгляд, для геномной идентификации гибридных растений далеко не исчерпаны методы исследования морфологии пыльцы. Известно, что эти признаки детерминированы генетически, выявляют специфику таксона, крайне широко используются в палеонтологии для определения возраста геологических отложений (Соколова, 1999).

Целью проведенной работы было выявить возможность применения некоторых морфологических характеристик пыльцевых зерен (среднего размера, количества морфологически полноценной пыльцы и количества многопертурной пыльцы) для геномной идентификации видов, сортов и гибридов вишни алтайского генофонда.

Методика. В качестве материала для исследований была привлечена пыльца двух дикорастущих видов вишни (*P. fruticosa*, *P. maakii*), трех сортов вишни обыкновенной (*P. cerasus*), шестнадцати отдаленных тетраплоидных и гексаплоидных сортов и гибридов, находящихся в генофонде НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко (г. Барнаул). Исследования выполнены в 2003–2016 гг. на оборудовании лаборатории биотехнологии и цитологии с использованием микроскопа Jenaval (*Zeiss*) и цифровой камеры для микроскопа TC-500 (ЛОМО). При обработке результатов исследований использован пакет прикладных программ *Microsoft Office Excel 2007*.

Для выявления степени фертильности (морфологической полноценности) пыльцы использована окраска ацетокармином, для подсчета количества многопертурной пыльцы – окраска основным фуксином по общепринятым методикам (Цитологическая ..., 1981; Паушева, 1988). Средний размер пыльцевых зерен определяли после окрашивания ацетокармином с пересчетом делений объект микрометра в микроны. Измеряли диаметр 50-ти пыльцевых зерен, лежащих анфас.

Результаты. Изучение варьирования среднего размера пыльцевых зерен показало, что у дикорастущих представителей вишни степной (ВС) пыльца достоверно мельче по сравнению с пыльцой вишни Маака (ЧМ), а также с пыльцой сортов культурной вишни обыкновенной (ВО). Та же аналогия проявляется по сравнению с размером пыльцы гибридных сортов и форм, полученных от скрещивания вишни степной с вишней обыкновенной (ВС+ВО) или скрещивания культурной вишни степной с вишней Маака (ВС+ВО)+ЧМ. В то же время средний диаметр пыльцевых зерен для всех гибридных вишен, сортов вишни обыкновенной и форм вишни Маака достоверно не различается между собой и составляет около 44 мкм (табл. 1).

Таблица 1

Размер пыльцевых зерен (мкм) у некоторых видов и гибридов рода *Prunus* L., 2006–2015 гг.

№ п/п	Генетическая группа по происхождению	2n	Всего форм	Средний размер	Min.–Max.	Коэффициент вариации (V)	Коэффициент Стьюдента средних размеров по генетическим группам (t)
1	<i>P. fruticosa</i> (ВС)	32	4	39,61 ± 0,27	31,5–51,6	3,3–5,6	–
2	<i>P. cerasus</i> (ВО)	32	3	44,93 ± 0,35	34,2–56,1	4,7–7,3	t _{1,2} = 12,09***
3	ВС+ВО	32	5	44,04 ± 0,44	33,6–69,6	4,6–28,9	t _{1,3} = 8,52*** t _{2,3} = 1,59
4	(ВС+ВО)+ВО	48	2	47,90 ± 0,51	36,3–64,2	5,9–8,6	t _{3,4} = 5,76***
5	<i>P. maakii</i> (ЧМ)	32	2	44,79 ± 0,39	38,2–54,0	3,5–8,4	t _{3,5} = 1,27
6	(ВС+ВО)+ЧМ, F ₁	32	1	41,80 ± 0,29	35,1–46,2	4,3–7,2	t _{5,6} = 6,10***
7	(ВС+ВО)+ЧМ, F ₃	32	6	44,36 ± 0,51	33,9–66,3	6,1–11,3	t _{3,7} = 0,48
8	(ВС+ВО)+ЧМ, F ₃₋₄	48	3	48,79 ± 0,57	38,4–63,9	5,6–14,3	t _{4,8} = 1,17 t _{7,8} = 5,83***

Примеч.: *** P > 0,001

Полученные результаты можно объяснить тем, что в культурной среде постоянно происходит отбор форм с большим количеством доминантных олигогенов по признакам размеров некоторых органов, в частности, по признаку крупноплодности. Не исключено, что все эти признаки генетически сцеплены с признаком величины пыльцевых зерен. Кроме того, можно предположить автополиплоидное происхождение тетраплоидной вишни Маака, по нашим исследованиям, формирующей в профазе мейоза до 8 тетравалентов (Мочалова, Матюнин, 2002). Известно, что автополиплоидия является очень распространенной геномной причиной укрупнения вегетативных и генеративных органов у растений в связи с изменением ядерно-плазменного клеточного баланса. Характерно, что в первом поколении церападусов F_1 выявлено достоверное уменьшение среднего размера пыльцы по сравнению с родительскими формами – гибридными алтайскими сортами и вишней Маака и также по сравнению с церападусами третьего и четвертого поколения F_{3-4} (табл. 1). Причиной может быть депрессивное состояние генома единственного изученного гибрида F_1 (АВЧ-2). Известно, что он не завязывает плодов. Данный вопрос требует дальнейшего изучения с привлечением дополнительных генотипов F_1 .

Гексаплоидное число геномов в клеточных ядрах ($2n = 48$) у гибридов вишни разного происхождения вызывает значительное увеличение среднего диаметра пыльцы до 47,9–48,8 мкм по сравнению с проявлением этого признака в диапазоне 39,6–44,8 мкм у тетраплоидов ($2n = 32$). При этом достоверной разницы между гексаплоидными церападусами и гексаплоидными гибридами другого происхождения не выявлено (табл. 1). Следует вывод, что средний диаметр пыльцы вишни может служить надежным диагностическим признаком для отбора спонтанных гексаплоидов в генофонде вишни без применения метода прямого цитологического подсчета числа хромосом.

Несколько другая картина по поиску маркеров «гибридности» выявлена в результате изучения морфологической полноценности формирования пыльцевых зерен или же по числу апертур в экзине пыльцевого зерна. На конкретном материале подтверждается та известная закономерность, что у аборигенных дикорастущих видов вишни обычно формируется большое количество фертильной (или морфологически полноценной) пыльцы с густой и ярко окрашенной цитоплазмой, не отстающей от оболочек, а также с недеформированными интиной и экзоиной. В то же время у межвидовых гибридов количество фертильной пыльцы обычно значительно снижается (Паушева, 1988). У дикорастущих форм *P. fruticosa* и *P. maakii* средняя фертильность пыльцы выявлена на уровне 73,7–86,0 %. У интродуцированных в сибирский климат малозимостойких сортов вишни обыкновенной (Любская, Келлерис, Тургеневка) этот показатель отмечен на более низком уровне – в среднем 48,9 %. При этом у отдельных генотипов он мог быть выше 70 % в зависимости от года цветения (табл. 2).

Таблица 2

Количество (%) фертильной и многоапертурной пыльцы у видов и гибридов рода *Prunus* L., 2003–2016 гг.

№ п/п	Генетическая группа по происхождению	2n	Всего форм	Количество фертильной пыльцы		Количество многоапертурной пыльцы	
				среднее	min.–max.	среднее	min.–max.
1	<i>P. fruticosa</i> (BC)	32	4	86,0 ± 0,5	45,0–93,0	0,5 ± 0,3	0–2,0
2	<i>P. cerasus</i> (BO)	32	3	48,9 ± 0,7	5,2–77,6	5,0 ± 0,3	0–20,3
3	BC+BO	32	5	45,3 ± 0,4	7,9–72,6	3,7 ± 0,2	0,5–46,1
4	(BC+BO)+BO	48	2	53,4 ± 0,6	15,4–81,1	52,8 ± 0,7	33,1–78,3
5	<i>P. maakii</i> (ЧМ)	32	2	73,7 ± 0,7	54,9–89,0	3,2 ± 0,4	0,2–7,5
6	(BC+BO)+ЧМ, F_1	32	1	54,4 ± 0,9	17,9–83,2	0,1 ± 0,01	0–1,9
7	(BC+BO)+ЧМ, F_3	32	4	22,3 ± 0,4	0,9–52,6	36,1 ± 0,6	0–74,9
8	(BC+BO)+ЧМ, F_{3-4}	48	3	60,5 ± 0,5	36,2–77,6	48,1 ± 0,6	7,2–87,8

У всех тетраплоидных генотипов гибридного происхождения количество фертильной пыльцы в среднем находилось на уровне сортов вишни обыкновенной (от 45,3 до 54,4 %), за исключением церападусов третьего-четвертого поколения, где их найдено в среднем 22,3 % (колебания от 0,9 до 52,6 %). У этих гибридов сильно выражена генетическая нестабильность, которая заключается в выщеплении некоторого количества генотипов с генетически обусловленной стерильностью пыльцы (типа ЦМС). Так, при относительно правильном течении мейоза и формировании значительного количества пол-

ноценных тетрад микроспор, у ряда церападусов (ВЧ 5-11-39 и ВЧ 89-95-53) на стадии одноядерной пыльцы наблюдается стерилизация значительной части пыльцевых зерен. Максимальная фертильность пыльцы за все годы исследований у этих конкретных генотипов не превышала уровня 26 %. В то же время у тетраплоидных церападусов без проявления ЦМС (ВЧ 8-83-44, ВЧ 10-97-280) фертильность пыльцы была выше и колебалась от 15,3 до 52,6 %.

У гексаплоидных гибридных генотипов одного происхождения фертильность пыльцы всегда была выше, чем у тетраплоидов того же самого происхождения. Так, средний размер пыльцы у гибридов вишни степной и вишни обыкновенной составил: у тетраплоидов – 45,3 %, у гексаплоидов – 53,4 %. У церападусов эти показатели были равны 22,3 и 60,5 % соответственно (табл. 2).

У косточковых растений выявлен трех-бороздно-поровый тип пыльцевых апертур, треугольная и несколько приплюснутая форма пыльцевого зерна (Соколова, 1999). Известно, что при полиплоидии увеличение числа геномов вызывает изменение не только величины, но и формы пыльцевых зерен – появляется пыльца с увеличенным количеством ростовых апертур в экзине, четырехугольной или еще более сложной конфигурации. У гексаплоидных гибридов вишни в среднем выявлено 48–53 % (при колебании от 7,2 до 87,8 %) многоапертурной пыльцы, в то время как у тетраплоидных гибридов их количество в среднем не превысило 36,1 % и варьировало от 0 до 74,9 % (табл. 2). Наблюдается явная корреляция мейотической нестабильности, проявляющейся в формировании у гибридов некоторого количества нередуцированных мужских гамет, с вариабельностью морфологических характеристик пыльцы. Так, у церападусов с генетически обусловленной стерильностью (ВЧ 5-11-39 и ВЧ 89-95-53) одновременно выявлено самое большое количество многоапертурных фертильных пыльцевых зерен (в среднем 59–62 %). Это свидетельствует о том, что нередуцированные микроспоры не подвергаются стерилизации в ходе гаметофитогенеза.

Таким образом, показатель среднего размера пыльцы может помочь достоверно идентифицировать тетраплоидные гибридные генотипы от негибридных генотипов тетраплоидной вишни степной. Показатель среднего размера пыльцы может служить маркером для предварительного выделения спонтанных гексаплоидных генотипов среди тетраплоидных генотипов вишни при произрастании их в одной селекционной популяции. Большое количество многоапертурной пыльцы (свыше 20 %) свидетельствует или о гексаплоидном наборе хромосом у конкретного генотипа или же о том, что в определенные годы он проявляет себя генетическим источником нередуцированных мужских гамет и может быть использован для направленного селекционного получения полиплоидов. Показатель фертильности пыльцы желательнее применять в комплексе с другими характеристиками для выявления гибридной или полиплоидной природы данного конкретного генотипа вишни.

ЛИТЕРАТУРА

- Еремин Г. В. Отдаленная гибридизация косточковых плодовых растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 229–238.
- Мочалова О. В., Матюнин М. Н. Цитоэмбриология и селекция отдаленных гибридов и полиплоидов косточковых растений на Алтае. – Новосибирск: РАСХН, Сиб. отд-ние, 2002. – 232 с.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
- Симагин В. С. Селекция вишни на устойчивость к коккомикозу в Сибири // Состояние и проблемы садоводства России: Сб. науч. тр. – Новосибирск, 1997. – Ч. 1. – С. 166–170.
- Соколова Е. А. Морфологические особенности пыльцы представителей подсемейства *Prunoideae* (Rosaceae) // Актуальные проблемы палинологии на рубеже третьего тысячелетия: Сб. науч. статей. – М.: ИГиРГИ, 1999. – С. 230–244.
- Субботин Г. И. Вишня в Южной Сибири. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2002. – 145 с.
- Цитологическая и цитоэмбриологическая техника (для исследования культурных растений): Метод. указания. – Л.: ВИР, 1981. – 118 с.
- Юшев А. А. Объем и систематика рода *Cerasus* Mill. и селекционное использование видового потенциала вишен // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – СПб.: ВИР, 1992. – Т. 146. – С. 16–26.
- Olden E. J., Nibon N. On the origin of *Prunus cerasus* // Hereditas, 1968. – № 59. – P. 327–345.
- Soltis D. E., Soltis P. S. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy // Crit. Rev. Plant Sci., 1993. – № 12. – P. 243–273.