

УДК 581.8:581.33:634.23

## Особенности репродукции мужских гамет у дикорастущих видов вишни (*Prunus* L.)

### Peculiarities of male gametes reproduction in wild cherry species (*Prunus* L.)

Мочалова О. В.

Mochalova O. V.

Федеральный алтайский научный центр агробιοтехнологий, Барнаул, Россия. E-mail: mochalov.olga@yandex.ru

The Federal Altaic Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Barnaul, Russia

**Реферат.** Интродукция растений любого вида в новые климатические условия может явиться причиной индукции нарушений в ходе формирования гамет. В статье рассмотрены особенности репродукции мужских гамет для четырех дикорастущих видов вишни (*Prunus fruticosa* Pall., *P. maackii* Rupr., *P. maximoviczii* Rupr., *P. pensylvanica* L.), интродуцированных в условия лесостепи Алтая (город Барнаул). Показано, что отмеченные аномалии в ходе микроспорогенеза, типы хромосомных ассоциаций и спорад, морфологические характеристики зрелой пыльцы больше зависят от индивидуальных особенностей конкретного генотипа, чем от видовой принадлежности растения и его числа хромосом. Все изученные виды рекомендуются для использования в селекции. Отборная форма вишни степной № 3 выделена в качестве генетического источника нередуцированных гамет.

**Summary.** The introduction of any plant species into new climatic conditions can cause induction of disturbances during of gametes formation. Features of male gametes reproduction for four wild cherry species (*Prunus fruticosa* Pall., *P. maackii* Rupr., *P. maximoviczii* Rupr., *P. pensylvanica* L.), introduced in the forest-steppe conditions of Altai (Barnaul), are considered. It is shown that the noted anomalies though the microsporogenesis course, types of chromosomal associations and ones of sporads, the morphophysiological characteristics of mature pollen depend more on the individual particularities of a single genotype than on the species plant belonging and its chromosome number. All studied species are recommended for use in breeding. The selective form No. 3 of steppe cherry is identified as an unreduced gametes genetic source.

Урал и Западная Сибирь не имеют аборигенных видов вишни (*Prunus* L.), за исключением вишни кустарниковой (*P. fruticosa* Pall.), произрастающей в березовых колках в степных биоценозах. Этот вид вишни отличается самой высокой зимостойкостью, но не устойчив к коккомикозу (Субботин, 2002). На Алтае для внесения в новые сорта вишни степной генов устойчивости к биотическим факторам среды планируется использовать пыльцу интродуцированных из других регионов видов вишни (Программа работ..., 2011). Известно, что интродукция растений в иные климатические условия обычно отрицательно влияет на протекание репродуктивных процессов при формировании гамет в пыльниках и зародышевых мешках (Поддубная-Арнольди, 1976). Для выявления возможности использования интродуцированных растений в селекции и прогнозирования результатов отдаленных скрещиваний важно иметь представление о количестве аномалий в ходе мейоза и о качестве пыльцы конкретных генотипов, планируемых в качестве родительских форм. Целью проведенной работы было выявить репродуктивные особенности микроспорогенеза и морфологические характеристики зрелой пыльцы у дикорастущих видов вишни, находящихся в алтайском генофонде, для определения возможности использования их в селекции.

В качестве материала для исследований взяты репродуктивные ткани четырех дикорастущих видов вишни (*P. fruticosa* Pall., *P. maackii* Rupr., *P. maximoviczii* Rupr., *P. pensylvanica* L.). Всего изучено 8 генотипов из генофонда Федерального алтайского научного центра агробιοтехнологий (ФАНЦА) (г. Барнаул). Мейоз в пыльниках и спорад микроспор исследовали после фиксации ацеталкоголем (1:3) и далее после окраски уксусным гематоксилином (Цитологические..., 1976). Фертильность (мор-

фологическая полноценность) зрелой пыльцы была определена после окраски ацетокармином. Жизнеспособность (физиологическая полноценность) пыльцевых зерен на третий день после выделения из пыльников изучена путем проращивания на искусственной питательной среде, содержащей 1 % агар-агара, 15 % сахарозы и 0,001 % борной кислоты (Паушева, 1988). Количество многопертурной пыльцы выявлено после окрашивания основным фуксином (Цитологическая ..., 1981). Исследования выполнены в 2003–2017 гг. с использованием микроскопа Jenaval (*Zeiss*) и цифровой камеры TC-500 (ЛОМО). При обработке результатов исследований использован пакет прикладных программ *Microsoft Office Excel 2007*.

У косточковых растений заложение спорогенных тканей в пыльниках происходит в октябре-ноябре года, который предшествует году цветения. Весной в апреле начало вегетации по времени совпадает с устойчивым переходом среднесуточной температуры за рубеж + 5 °С. Начало мейоза в пыльниках у большинства видов отмечено на стадии набухания цветочных почек, обозначаемой как «зеленый конус», когда покровные почечные чешуи еще закрыты. В состоянии ранней профазы мейоциты могут находиться довольно значительное время – до тех пор, пока дневная температура воздуха устойчиво (в течение не менее трех дней) не перейдет рубеж в +16°С. Отрезок времени от начала мейоза в пыльниках до его окончания составляет около трех дней. Спорогенные органы, клетки и хромосомы косточковых растений относят к числу мелкогабаритных. Длина репродуктивных органов на момент начала мейоза зависит от вида вишни. Для разных видов наиболее вариабельные показатели отмечены для признаков длины цветочной почки и длины бутона. В то же время размеры пыльников, соответствующие началу и окончанию процесса мейоза, отличаются не значительно. У всех изученных видов они составляют около 0,1–0,2 мм соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Соответствие размеров и внешнего вида органов цветка началу и окончанию микроспорогенеза у дикорастущих видов вишни (*Prunus L.*)

Вид вишни	Цветочная почка		Бутон, мм		Пыльник, мм	
	размер, мм	внешний вид	начало мейоза	окончание мейоза	начало мейоза	окончание мейоза
<i>P. fruticosa</i>	45–65	«зеленый конус»	2,0–2,1	2,5	0,1	0,2–0,3
<i>P. maackii</i>	65–120	«зеленый конус»	2,0	2,2	0,1	0,2
<i>P. pensylvanica</i>	40–48	раскрытая	1,8–2,2	2,8	0,1	0,2–0,3
<i>P. maximoviczii</i>	72–105	«зеленый конус»	1,5–1,8	2,5	0,1	0,2

В цветках внизу соцветия мейоз начинается раньше по времени, чем в верхних бутонах. Обычно, если в нижних цветках обнаружена стадия тетрад микроспор, то в верхних – начало профазы. Мейоциты на стадии профазы функционируют в целом синхронно, но затем, особенно во втором делении, встречаются как тетрады микроспор, так и мейоциты на стадии профазы. Мейоз в пыльниках проходит по симультанному типу. Тапетум в пыльниках растворяется в период формирования спорад и молодой одноядерной пыльцы (Мочалова, Матюнин, 2002).

Общепризнано, что автополиплоидия (самоудвоение конкретного видового генома) в филогенезе видов вишни в большей степени нарушает течение мейоза, чем аллополиплоидия (самоудвоение гибридного генома, полученного от скрещивания разных видов) за счет формирования поливалентных ассоциаций хромосом. Смещение оптимального соотношения генно-ядерного содержимого и клеточного объема у тетраплоидных видов обычно является цитологическим механизмом, запускающим аномалии в ходе мейоза (Эллиот, 1961; Поддубная-Арнольди, 1976). Нормальное течение мейоза у растений в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей конкретного генотипа, включая его плоидность, но также и от погодных условий в период формирования и деления спорогенной ткани. У исследованных диплоидных (2n=16) и тетраплоидных (2n=32) видов вишни мейоз в пыльниках протекает в большинстве мейоцитов правильно, без аномалий. В зависимости от вида среднее количество мейоцитов с нарушениями варьировало от 14,2 до 29,0 % от общего числа делящихся клеток (табл.2).

Таблица 2

## Цитологические характеристики микроспорогенеза (%) у дикорастущих видов вишни

Вид, генотип	Количество аномалий		Хромосом в четнократных ассоциациях	Эуплоидных пластинок в метафазе II	Правильных тетрад микроспор	Диад + триад микроспор
	всего	из них с цитомиксисом				
<i>P. fruticosa</i> № 1	18,0 ± 0,8	5,6 ± 0,5	98,8	80,2	89,5	0,3
<i>P. fruticosa</i> № 2	22,6 ± 0,8	10,4 ± 0,6	92,1	60,0	89,8	0,2
<i>P. fruticosa</i> № 3	27,1 ± 1,1	17,8 ± 1,0	–	74,6	89,4	5,9
<i>P. maackii</i>	18,7 ± 0,8	5,1 ± 0,5	96,2	64,8	90,9	0,1
<i>P. pensylvanica</i> № 1	29,0 ± 0,9	27,1 ± 0,8	97,5	94,7	85,0	0,7
<i>P. pensylvanica</i> № 2	14,2 ± 0,8	11,0 ± 0,7	99,1	89,0	96,1	0,2
<i>P. pensylvanica</i> № 3	23,7 ± 1,1	20,0 ± 1,0	97,4	87,8	91,1	1,8
<i>P. maximoviczii</i>	23,7 ± 0,9	21,8 ± 1,0	99,5	84,9	95,7	0,2

Примечание: (–) – данных не получено

Среди встреченных типов нарушений в мейозе выявлены цитомиксис и аномалии универсального характера. Их соотношение всегда индивидуально для каждого генотипа. Индивидуальны также показатели соотношения между собой количества хромосом, участвующих в образовании четнократных хромосомных ассоциаций, эуплоидных хромосомных пластинок в метафазе второго деления, морфологически-правильных тетрад, триад и диад микроспор (табл. 2).

Цитомиксис представляет собой еще недостаточно изученный процесс хаотичного перемещения хроматидного материала по цитомиктическим каналам между мейоцитами, начиная со стадии профазы. Он может привести к полной дестабилизации процесса деления, к дегенерации и уничтожению больших площадей спорогенных клеток. У изученных видов вишни число клеток с цитомиксисом составило 27,3–93,4 % от общего числа клеток с нарушениями мейоза. В большей степени цитомиксис был выражен у вишни пенсильванской (77,5–93,4 %), а также и у вишни Максимовича (92,0 %), в меньшей степени – у вишни степной (31,1–65,7 % клеток). У вишни Маака отмечен самый низкий процент (27,3 %) мейоцитов с цитомиксисом (табл. 2).

Нарушения универсального типа (6,6–72,7 % от общего числа клеток с аномалиями) представлены «отставаниями» и «забеганиями» хромосом, «выбросами» хромосом за пределы клеточного веретена в цитоплазму, хромосомными и хроматидными «мостами», численно неравным расхождением хромосом к полюсам. Их появление зависит от правильного функционирования веретена деления. Кроме того, они имеют причиной формирование разных типов хромосомных ассоциаций в конце профазы первого деления. Известно, что, чем больше хромосом находится в четнократных ассоциациях (бивалентах, тетравалентах) и меньше в нечетнократных (тривалентах, унивалентах), тем правильнее проходит мейоз, и тем более сбалансированным получается хромосомный состав гамет (Эллиот, 1961). У исследованных тетраплоидных видов вишни конъюгация хромосом проходила с образованием тетра-, три-, би- и унивалентов (табл. 3). У вишни степной, имеющей предположительное аллополиплоидное происхождение, формирование примерно одного тетравалента на клетку свидетельствует об участии в образовании исходного предка этого вида нередуцированной гаметы, или же один из родителей у него был тетраплоидом. У тетраплоидной вишни Маака в среднем на клетку приходится 5 тетравалентов (20 хромосом), что является очень высоким показателем и свидетельствует в пользу гипотезы об автополиплоидном происхождении этого вида. В отдельных мейоцитах у этого вида число тетравалентов часто достигало 8 шт. на клетку. У диплоидных генотипов вишни пенсильванской (№ 2 и № 3) отмечено редкое образование одного тетравалента на клетку (3–4 % делений от общего числа материнских клеток пыльцы).

У изученных видов вишни выявлено большое количество внешне правильно сформированных тетрад микроспор, которое колебалось от 85,0 до 96,1 % (вишня пенсильванская). Для генотипов виш-

Таблица 3

Количество хромосомных ассоциаций разного типа у дикорастущих видов вишни (шт./ клетку)

Вид, генотип	2n	Типы хромосомных ассоциаций			
		тетраваленты	триваленты	биваленты	униваленты
<i>P. fruticosa</i> № 1	32	0,94	0	13,93	0,38
<i>P. fruticosa</i> № 2	32	1,0	0,09	12,73	2,27
<i>P. maackii</i>	32	5,07	0	5,25	1,22
<i>P. pensylvanica</i> № 1	16	0	0	7,80	0,40
<i>P. pensylvanica</i> № 2	16	0,03	0	7,87	0,14
<i>P. pensylvanica</i> № 3	16	0,04	0	7,71	0,42
<i>P. maximoviczii</i>	16	0	0	7,96	0,08

ни степной их найдено 89,4–89,8 %. У одного из генотипов вишни степной (ВС № 3) в среднем формируется 5,9 % диад и триад микроспор. Учитывая, что ядра диад и одна из ядер триады не сопровождаются редукцией числа хромосом, это генотип был выделен в качестве генетического источника нередуцированных мужских гамет.

По качеству пыльцы все изученные генотипы вишни оказались пригодны в качестве опылителей. Средняя фертильность пыльцы у них находилась на уровне 70,6–82,6 %, жизнеспособность составила 17,8–41,0 %. Самые высокие показатели качества пыльцы были у вишни Максимовича. Для остальных видов характерна вариабельность данных показателей в зависимости от генотипа. Особенно это характерно для генотипов вишни пенсильванской (табл. 4). В среднем не более 7,5 % аномалий в формировании пыльцы связано с многоапертурными (четырёх-шестипоровыми) пыльцевыми зёрнами. В норме они трёх-апертурные. Такие пыльцевые зёрна обычно содержат увеличенный (эуплоидный или анеуплоидный) набор хромосом. Исключение составил один генотип вишни пенсильванской (№ 2), который в 2011 г. выдал до 54,3 % многоапертурной пыльцы. Причина этого явления непонятна и, возможно, связана с цитомиксисом.

Таблица 4

Морфофизиологические характеристики пыльцевых зёрен (%)  
у дикорастущих видов вишни, 2003–2017 гг.

Вид	2n	Фертильность		Жизнеспособность		Многоапертурной пыльцы	
		среднее	min. – max.	среднее	min. – max.	среднее	min. – max.
<i>P. fruticosa</i>	32	70,6 ± 0,6	45,0–94,3	27,4 ± 0,6	3,9–43,4	0,8 ± 0,2	0,1–0,2
<i>P. maackii</i>	32	74,5 ± 0,6	60,0–89,0	17,8 ± 0,6	5,7–26,4	3,7 ± 0,4	0,2–7,5
<i>P. pensylvanica</i>	16	76,1 ± 0,5	24,9–97,6	22,9 ± 0,5	3,3–47,9	9,3 ± 0,5	0–54,3
<i>P. maximoviczii</i>	16	82,6 ± 1,0	64,5–97,6	41,0 ± 1,3	31,7–59,9	0,3 ± 0,1	0,2–0,4

Таким образом, в результате проведенных исследований выяснено, что у четырех индуцированных в условия лесостепи Алтая видов вишни выявленные аномалии в ходе микроспорогенеза и морфофизиологические характеристики зрелой пыльцы в большей степени зависят от индивидуальных особенностей генотипа и в меньшей степени – от видовой принадлежности растения и его числа хромосом. Все изученные виды вишни рекомендуются для использования в селекции. Отборная форма вишни ВС № 3 выделена в качестве генетического источника тетраплоидных гамет.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 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.

*Поддубная-Арнольди В. А.* Цитоэмбриология покрытосеменных растений. – М: Наука, 1976. – 507 с.

Программа работ селекцентра Научно-исследовательского института садоводства Сибири имени М. А. Лисавенко до 2030 г.: Выпуск 3 / Россельхозакадемия. ГНУ НИИСС Россельхозакадемии. – Новосибирск, 2011. – С 113–131.

*Субботин Г. И.* Вишня в Южной Сибири. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2002. – 145 с.

Цитологическая и цитоэмбриологическая техника (для исследования культурных растений) / Методические указания. – Л.: ВИР, 1981. – С. 63.

Цитологические исследования плодовых и ягодных культур // Методические рекомендации. / Под ред. Г. А. Курсакова. – Мичуринск: ЦГЛ, 1976. – 104 с.

*Эллиот Ф.* Селекция растений и цитогенетика / под ред. А. Р. Жербака. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1961. – 447 с.