

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ГИБРИДНЫХ СЕЯНЦЕВ ЯБЛОНИ ОТ РАЗНОХРОМОСОМНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ

А.Г. Бородкина , Н.Г. Лаврусевич, М.А. ЗубковаФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, info@vniispk.ru**Аннотация**

При включении в селекцию полиплоидных форм необходимо постоянно проводить цитологический контроль гибридного потомства. В данной статье приведены данные по анализу плоидности гибридов яблони от разнохромосомных скрещиваний типа $2x \times 4x$. Научная новизна заключается в исследовании статуса плоидности новых ранее неизученных гибридных семей яблони, что позволяет выявить семьи, давшие наибольший выход триплоидных гибридов, которые могут представлять практический интерес. Исследования проводились по методикам: Каптарь С.Г. (1967) и Паушевой З.П. (1980). Плоидность определяли у 266 растений из 6-ти гибридных семей: 6534, 6519, 6520, 6533, 6491, 6535. В результате установлено, что в семье 6534 [Северный синап($2x$) \times 25-35-124 ($4x$)] из 95 изученных растений 99% сеянцев оказались триплоидными – $2n = 3x = 51$, 1% – диплоидным, $2n = 2x = 34$. В семьях 6519 [Московское ожерелье ($2x$) \times 30-47-88 ($4x$)] и 6520 [Приокское ($2x$) \times 13-6-10 ($4x$)] – 100% триплоидных сеянцев. В комбинации скрещивания Орлик ($2x$) \times 30-47-88 ($4x$) выход триплоидных сеянцев составил 98%. В двух семьях (6533, 6491) в качестве отцовского родителя был взят тетраплоид 25-37-45, а в качестве материнских растений диплоиды: Северный синап ($2x$) и Уэлси ($2x$). Анализ плоидности показал, что в семье 6533 [Северный синап ($2x$) \times 25-37-45 ($4x$)] образовалось 94% триплоидных растений и 6% диплоидных, а в семье 6491 [Уэлси ($2x$) \times 25-37-45 ($4x$)] процент триплоидных растений меньше и составил 79%, а диплоидных – 21%, предположительно на меньший выход триплоидов в данном случае повлиял диплоидный компонент. В среднем по всем комбинациям скрещивания 94% растений были триплоидными, 6% гибридов яблони – диплоидными.

Ключевые слова: плоидность, хромосомы, *Malus domestica*, селекция

CYTOLOGICAL SCREENING OF APPLE HYBRID SEEDLINGS FROM HETEROCHROMOSOMAL CROSSES

A.G. Borodkina , N.G. Lavrusevich, M.A. ZubkovaRussian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPК, info@vniispk.ru**Abstract**

When polyploid forms are included in breeding, it is constantly necessary to carry out cytological control of hybrid offspring. This article presents data on the analysis of the ploidy of apple hybrids from heterochromosomal crosses of $2x \times 4x$ type. The scientific novelty lies in the study of the ploidy status of new previously unexplored hybrid families of apple trees, which allows to identify the families that gave the greatest yield of triploid hybrids that may be of practical interest. The research was carried out according to methods of Kaptar S.G. (1967) and Pausheva Z.P. (1980). Ploidy was determined in hybrid families: 6534, 6519, 6520, 6533, 6491 and 6535. As a result, it turned out that in the family 6534 [Severny Sinap ($2x$) \times 25-35-124 ($4x$)], 99% of seedlings of 95

studied plants were triploid with $2n = 3x = 51$ chromosomes and 1% was diploid with $2n = 2x = 34$ chromosomes. In families 6519 [Moskovskoye Ozherelie ($2x$) × 30-47-88 ($4x$)] and 6520 [Prikskoye ($2x$) × 13-6-10 ($4x$)], 100% of seedlings were triploid. In the combination of crossing Orlik ($2x$) × 30-47-88 ($4x$), the yield of triploid seedlings was 98%. In two families (6533, 6491), tetraploid 25-37-45 was taken as the paternal parent, and diploids were taken as the maternal plants: Severny Sinap ($2x$) and Wealthy ($2x$). Ploidy analysis showed that in the family 6533 [Severny Sinap ($2x$) × 25-37-45 ($4x$)] 94% of triploid plants and 6% of diploid plants were formed, and in the family 6491 [Wealthy ($2x$) × 25-37-45 ($4x$)] the percentage of triploid plants was less and amounted to 79%, and 21% of diploid plants, presumably the lower yield of triploids in this case was influenced by the diploid component. On average, 94% of studied plants were triploid and 6% of apple hybrids were diploid for all crossing combinations.

Key words: ploidy, chromosomes, *Malus domestica*, breeding

Введение

Предметом внимания для сельскохозяйственной науки является пополнение генофонда плодовыми растениями, которые будут высокоурожайны, адаптированы к изменениям условий окружающей среды, устойчивы к различным заболеваниям, а также будут обладать высокими товарными и вкусовыми качествами. Среди всех плодовых растений мира яблоне принадлежит первое место по площади посадок и по урожаю. Главным поставщиком сортовых яблонь в России в последнее время является ВНИИСПК (Седов и др., 2022). Во ВНИИСПК академик РАН Седов Е.Н. совместно с цитологом, доктором сельскохозяйственных наук Седышевой Г.А. с 1970 года начали одними из первых проводить селекцию яблони на полиплоидном уровне для создания триплоидных сортов (Седышева и др., 2013). Было доказано, что с помощью этого метода существенно увеличивается возможность получения новых триплоидных сортов с высокой адаптационной способностью и большим биологическим потенциалом, пригодных для возделывания в садах интенсивного типа (Горбачева, Клименко, 2019). В лаборатории цитозембриологии по настоящее время продолжают исследования по цитологическому контролю селекционной школки сеянцев, а также проводится цитозембриологическая оценка исходных форм для селекции яблони с целью получения новых сортов. Большой интерес для селекционеров представляет создание триплоидных растений от разнохромосомное скрещиваний типа: диплоид × тетраплоид, тетраплоид × диплоид (Горбачева и др., 2018). Было выявлено, что гибриды с тройным набором хромосом, превосходят диплоиды и тетраплоиды по ряду показателей. У триплоидных сортов яблони по сравнению с диплоидными наблюдаются более выгодные признаки – регулярное плодоношение, крупные плоды и устойчивость к парше. Тетраплоидные формы не имеют коммерческой ценности из-за низкого качества плодов (Седов и др., 2020). Также у них отмечается низкая устойчивость к холоду, поэтому в основном их используют в качестве отцовского компонента для создания триплоидных сортов (Седов и др., 2013). Необходимо учитывать, что не все тетраплоидные формы являются донорами диплоидных гамет, а только те у которых тетраплоидный набор хромосом находится в субэпидермальном слое конуса роста, из которого формируются генеративные ткани цветка. (Седов и др., 2008, Седов и др., 2020). Необходимо исследовать состояние их генеративной сферы для возможности использования в селекции и проводить анализ пloidности гибридного потомства от разнохромосомных скрещиваний с целью отбора перспективных форм (Горбачева и др., 2018).

Во ВНИИСПК на настоящий момент выведено около двадцати триплоидных сортов, полученных путем скрещивания различных диплоидных и тетраплоидных форм (Седов и др., 2019).

С привлечением в селекционный процесс полиплоидов требуется постоянный достаточно трудоемкий цитологический контроль гибридного потомства для дальнейшего отбора триплоидных генотипов (Макаренко, 2015). Из вышесказанного следует, что цитологический скрининг должен проводиться для всех полиплоидных форм, включенных в селекцию, поэтому данное направление является актуальным.

Научная новизна заключается в исследовании статуса пloidности новых ранее неизученных гибридных семей яблони, что позволяет выявить семьи, давшие наибольший выход триплоидных гибридов, которые могут представлять практический интерес.

Цель нашего исследования - проведение цитологического анализа пloidности сеянцев от скрещивания диплоид \times тетраплоид, для выделения растений с тройным набором хромосом.

Материалы и методики исследований

Объектами исследований являлись гибридные сеянцы, размещенные в селекционных и коллекционных насаждениях ВНИИСПК. Определяли пloidность 266 растений из шести гибридных семей: 6534 [Северный синап(2x) \times 25-35-124 (4x)], 6519 [Московское ожерелье(2x) \times 30-47-88 (4x)], 6520 [Приокское (2x) \times 13-6-10 (4x)], 6533 [Северный синап (2x) \times 25-37-45 (4x)], 6491 [Уэлси (2x) \times 25-37-45 (4x)], 6535 [Орлик (2x) \times 30-47-88 (4x)].

Для определения пloidности брали верхушечные меристемы вегетативных почек. Фиксация материала (без предварительной обработки) производилась в уксусном спирте (3 части 96%-ого этилового спирта + 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение суток. После фиксации материал промывали в трёх сменах 96% этилового спирта и помещали на хранение в 70% этиловый спирт. Окрашивание образцов проводили пропионо-лакмоидным методом (Каптарь, 1967). Для приготовления красителя 5 г лакмоида растворяли в 50 мл 50%-й пропионовой кислоты. Полученный раствор ставили в темное место на 3...5 дней; колбу периодически встряхивали. Затем раствор фильтровали и хранили в темном месте, используя в работе как стандартный. После этого материал переносили в термостойкую пробирку с 0,5 мл 45%-й уксусной кислоты, доводили до кипения на спиртовке и кипятили в течение 5...30 с (не более) для мацерации объекта. После этого почки переносили на предметное стекло в каплю хлоралгидрата, накрывали покровным стеклом. Хромосомы окрашиваются в коричневый цвет. Контрастность окраски увеличивается при хранении препарата, поэтому готовый препарат оставляли на 30 мин для дифференцировки (Паушева, 1980).

Визуализация хромосом проводилась методом световой микроскопии на микроскопе Nikon Eclipse 50i и 80i с увеличением 100x. Для определения пloidности у каждого гибрида было изучено от 5 до 10 метафазных пластинок.

Результаты исследования

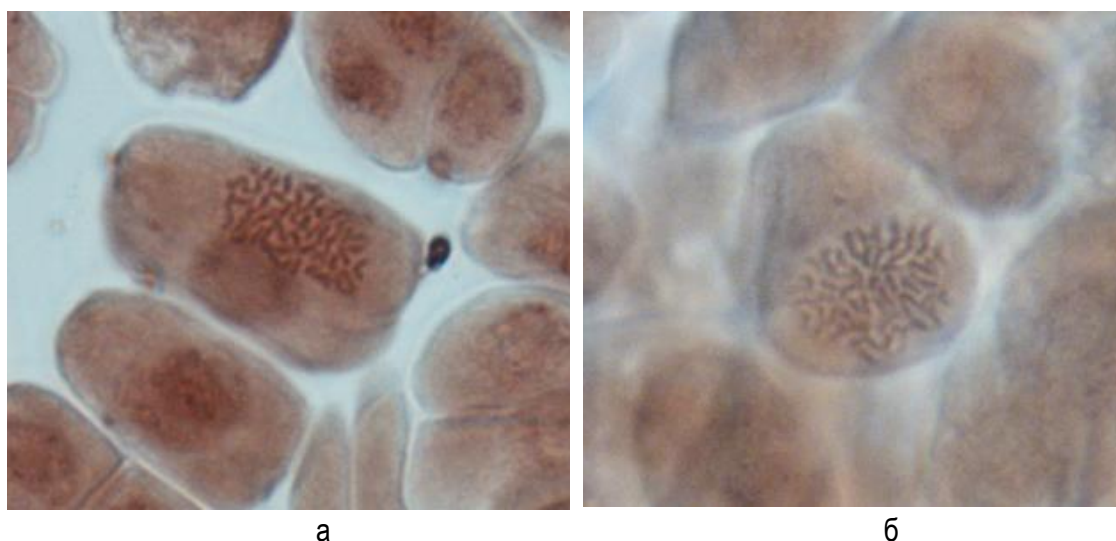
Проведен анализ пloidности гибридных сеянцев яблони от разнохромосомных скрещиваний в количестве 266 растений из 6 семей. В скрещиваниях в качестве доноров диплоидных гамет были взяты тетраплоидные формы 30-47-88(4x), 25-35-124(4x), 13-6-10 (4x), 25-37-45 (4x).

В семье Северный синап(2x) \times 25-35-124 (4x) из 95 изученных растений 99% сеянцев оказались триплоидными с $2n = 3x = 51$ хромосома, 1% – диплоидными с $2n = 2x = 34$ хромосомы. В семьях Московское ожерелье (2x) \times 30-47-88 (4x) и Приокское (2x) \times 13-6-10

(4x) 100% триплоидных сеянцев. В комбинации скрещивания Орлик (2x) × 30-47-88 (4x) выход триплоидных сеянцев составил 98%. В двух семьях (6533, 6491) в качестве отцовского родителя был взят тетраплоид 25-37-45, а в качестве материнских растений диплоиды Северный синап (2x) и Уэлси (2x). Анализ плоидности показал, что в семье Северный синап (2x) × 25-37-45 (4x) образовалось 94% триплоидных растений и 6% диплоидных, а в семье Уэлси (2x) × 25-37-45 (4x) процент триплоидных растений меньше и составил 79%, а диплоидных – 21%, предположительно на меньший выход триплоидов в данном случае повлиял диплоидный компонент. Все комбинации скрещиваний с тетраплоидными формами (25-35-124, 30-47-88, 13-6-106, 25-37-45) в качестве опылителей, дали высокий выход триплоидных гибридов. В среднем по всем комбинациям скрещивания 251 растение (94%) оказались триплоидными с $2n = 3x = 51$ хромосома, 6% гибридов – диплоидными с $2n = 2x = 34$ хромосомы (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 – Плоидность гибридных сеянцев яблони в селекционной школке

№ семьи	Название семьи	Всего растений, шт.	В том числе:	
			2x, шт./%	3x, шт./%
6534	Северный синап(2x) × 25-35-124 (4x)	95	1/1	94/99
6519	Московское ожерелье(2x) × 30-47-88 (4x)	3	0	3/100
6520	Приокское (2x) × 13-6-10 (4x)	2	0	2/100
6533	Северный синап (2x) × 25-37-45 (4x)	31	2/6	29/94
6491	Уэлси (2x) × 25-37-45 (4x)	48	10/21	38/79
6535	Орлик (2x) × 30-47-88 (4x)	87	2/2	85/98
	Всего	266	15/6	251/94

Рисунок 1 – Триплоидный набор хромосом ($2n = 3x = 51$) гибридных сеянцев яблони из семьи: а – Уэлси (2x) × 25-37-45 (4x); б – Северный синап (2x) × 25-35-124 (4x)

Выводы

В результате проведенных исследований определена плоидность гибридных сеянцев яблони в семьях: Северный синап (2x) × 25-35-124 (4x), Московское ожерелье (2x) × 30-47-88 (4x), Приокское (2x) × 13-6-10 (4x), Северный синап (2x) × 25-37-45 (4x), Уэлси (2x) × 25-37-45 (4x), Орлик (2x) × 30-47-88 (4x). Из 266 изученных растений 251 растение (94%) – триплоиды с $2n = 3x = 51$ хромосома и 15 (6%) гибридов – диплоиды с $2n = 2x = 34$ хромосомы. Высокий

выход триплоидных сеянцев позволяет рекомендовать изученные комбинации скрещивания для получения растений с тройным набором хромосом.

Литература

1. Горбачева Н.Г., Седов Е.Н., Клименко М.А. Цитологический контроль в селекции яблони на полиплоидном уровне // Современное садоводство. 2018. № 1. С. 18-23. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10103>. EDN: [YWPHBK](#)
2. Горбачева Н.Г., Клименко М.А. Цитологический контроль гибридных сеянцев, исходных форм яблони в селекции на полиплоидном уровне // Современное садоводство. 2019. № 1. С. 25-31. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10103>. EDN: [SDZLPG](#)
3. Каптарь С.Г. Новый ускоренный метод изучения митотических и мейотических хромосом растений с помощью пропионо-лактоида // Цитология и генетика. 1967. Т. 1, № 4. С. 87-90.
4. Макаренко С.А. Морфобиологические признаки гибридных сеянцев яблони от гетероплоидных скрещиваний в селекционном питомнике и их сопряженность с плоидностью // Селекция и сорторазведение садовых культур: материалы международной научно-практической конференции. Орёл: ВНИИСПК, 2015. С. 130-133. EDN: [UQEAGD](#)
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Колос, 1980. 304 с.
6. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008. 368 с.
7. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Горбачева Н.Г., Мельник С.А. Селекционная оценка гетероплоидных скрещиваний при создании триплоидных сортов яблони // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 3. С. 499-508. EDN: [RUHMUD](#)
8. Седов Е.Н., Серова З.М., Янчук Т.В., Корнеева С.А. Триплоидные сорта яблони селекции ВНИИСПК для совершенствования сортимента (популяризация селекционных достижений). Орел: ВНИИСПК, 2019. 28 с.
9. Седов Е.Н., Янчук Т.В., Корнеева С.А. Методы и результаты селекции яблони во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции плодовых культур // Российская сельскохозяйственная наука. 2020. № 5. С. 25-29. <https://doi.org/10.31857/S2500262720050063>. EDN: [LNMZUG](#)
10. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Янчук Т.В. Новые триплоидные сорта яблони, иммунные к парше // Наше сельское хозяйство. 2020. № 1. С. 110-113. EDN: [QPYKBZ](#)
11. 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. <https://doi.org/10.30850/vrsn/2022/1/25-31>. EDN: [LNMPZP](#)
12. Седышева Г.А., Седов Е.Н., Горбачева Н.Г., Серова З.М., Мельник С.А. Цитологический контроль в селекции яблони на полиплоидном уровне // Достижения науки и техники в АПК. 2013. № 7. С.11-13. EDN: [QUUVWF](#)

References

1. Gorbacheva, N.G., Sedov, E.N., & Klimenko, M.A. (2018). Cytological control in apple breeding on a polyploidy level. *Contemporary horticulture*, 1, 18-23. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10103>. EDN: [YWPHBK](#) (In Russian, English abstract).
2. Gorbacheva, N.G., & Klimenko, M.A. (2019). Cytological control of hybrid seedlings and origin genotypes of apple in breeding with polyploidy using. *Contemporary horticulture*, 1, 25-31. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10103>. EDN: [SDZLPG](#) (In Russian, English abstract).

3. Kaptar, S.G. (1967). A new accelerated method for studying mitotic and meiotic chromosomes of plants using propionolactamide. *Cytology and Genetics*, 1(4), 87-90. (In Russian).
4. Makarenko, S.A. (2015) Morphobiological characters of apple hybrid seedlings from heteroploid crossings in a breeding nursery and their conjugation with ploidy. In *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops: proc. sci. conf.* (pp. 130-133). Orel: VNIISPK. EDN: [UQEAGD](#) (In Russian).
5. Pausheva, Z.P. (1980). *Practicum on plant cytology*. Kolos. (In Russian).
6. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., & Serova, Z.M. (2008). *Apple breeding at the polyploidy level*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
7. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Serova, Z.M., Gorbacheva, N.G., & Melnik, S.A. (2013). Breeding assesment of heteroploid crosses in the development of triploid apple varieties. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 17(3), 499-508. EDN: [RUHMUD](#) (In Russian, English abstract).
8. Sedov, E.N., Serova Z.M., Yanchuk T.V., & Korneeva, S.A. (2019). *Triploid apple cultivars of VNIISPK breeding for improving the assortment (popularization of breeding achievements)*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
9. Sedov, E.N., Yanchuk, T.V., & Korneeva, S.A. (2020). Stages, methods and results of apple breeding at the Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding. *Rossiiskaia selskokhoziaistvennaia nauka*, 5, 25-29. <https://doi.org/10.31857/S2500262720050063>. EDN: [LNMZUG](#) (In Russian, English abstract).
10. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Serova, Z.M., & Yanchuk, T.V. (2020). New triploid apple cultivars immune to scab. *Our agriculture*, 1, 110-113. EDN: [QPYKBZ](#) (In Russian).
11. Sedov, E.N., Yanchuk, T.V., & Korneeva, S.A. (2022). New diploid, triploid, immunal to scab and column-like apple tree varieties in assortment improvement. *Bulletin of the Russian Agricultural Science*, 1, 25-31. <https://doi.org/10.30850/vrsn/2022/1/25-31>. EDN: [LNMPZP](#) (In Russian, English abstract).
12. Sedysheva, G.A., Sedov, E.N., Gorbacheva, N.G., Serova, Z.M., & Melnik, S.A. (2013). Cytological control in apple breeding on a polyploidy level. *Achievements of science and technology in AIC*, 7, 11-13. EDN: [QUUVWF](#) (In Russian, English abstract).

Авторы:

Анастасия Геннадьевна Бородкина, младший научный сотрудник лаборатории цитозембриологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», borodkina@orel.vniispk.ru

Наталья Геннадьевна Лавруевич, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией цитозембриологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», lavrusevich@orel.vniispk.ru

Мария Александровна Зубкова, младший научный сотрудник лаборатории цитозембриологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», zubkovam@orel.vniispk.ru

Authors details:

Anastasia Borodkina, junior researcher at The laboratory of cytoembryology of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK)

Natalia Lavrusevich, PhD in Agriculture, senior researcher, Head of laboratory of cytoembryology in Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK)

Maria Zubkova, junior researcher at The laboratory of cytoembryology of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK)