

**Е.А. Долматов**, доктор сельскохозяйственных наук  
**В.Е. Джафарова**, кандидат сельскохозяйственных наук  
 Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, г. Орел, Россия

УДК 634.135.581.163

## Апомиксис и проблема получения гаплоидов и гомозиготных диплоидов у груши (*Pyrus communis* L.)

Наведені результати досліджень по стимулятивному апоміксису в груші, а також використання його для отримання гаплоїдів і гомозиготних диплоїдів.

Встановлено, що 50% сортів груші через те, що не відбулися віддалені гібридизації, здатні утворювати насіння апоміктичного походження, яке дає початок диплоїдним рослинам.

Виділені генотипи з максимальною схильністю до апоміксису.

Апоміктичним сіянцям груші, отриманим у результаті чужорідного запилення, в межах однієї й тієї ж комбінації властиве більш морфологічне різноманіття. У плодоносному стані апомікти, що походять від однієї материнської рослини, різняться між собою в тій же мірі, що й гібридні сіянці однієї родини.

За використання генетичних маркерів встановлено, що початок апоміктичному насінню дають зародкові мішки, у яких відбувся мейоз.

Показано використання методу *in vitro* з метою збільшення виходу апоміктичних рослин.

Найбільше індукування апоміктичних пагонів *in vitro* досягалося чергуванням концентрацій цитокініна БАП дозою 1 мг/л та 2 мг/л на фоні 1,5 мг/л ГК. Використання щеплення пагонами *in vitro* на нестерильні підвої груші звичайної збільшило вихід рослин до 80%. Подана цитологічна оцінка 9 апоміктичних зразкам. Цитологічний аналіз зразків апоміктичних форм підтвердив наявність у груші стимулятивного гаплоїдного партеногенеза.

### Ключові слова:

стимулятивний партеногенез, гаплоїд.

**Введение.** Подбор исходного материала для скрещиваний, базирующийся на глубоких селекционно-генетических и биологических исследованиях, является одним из самых значимых, так как, в конечном итоге, определяет эффективность той или иной селекционной программы. Важная роль при этом отводится созданию и вовлечению в селекционный процесс новых комплексных источников и доноров хозяйственно-ценных признаков, представляющих собой высокогомозиготные формы. Их использование в селекционной практике дает возможность значительно сократить объемы гибридных семей, осуществить переход к скрещиваниям, контролируемым на уровне гамет, и заранее прогнозировать результаты скрещиваний [1].

У плодовых растений получение таких форм в результате длительного инцухта практически неосуществимо, поскольку к самостерильности, инбредной депрессии и необходимости принудительного самоопыления в течение 9–10 поколений добавляется еще и продолжительный ювенильный период. Поэтому почти единственной возможностью создания гомозиготных форм у многолетних древесных растений является использование гаплоидов [2].

Получение гаплоидов посредством культуры пыльников или через гаплоидный апомиксис – обычное явление в селекции многих сельскохозяйственных культур, в плодовых же оба эти направления находятся в стадии разработки.

Исследования по культуре пыльников вишни и яблони проводятся во Франции, Китае, Японии, и Германии [3, 4, 5]. В России по этому пути идут ученые из ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина [6]. Работы по гаплоидному партеногенезу яблони осуществляются во Франции и Китае [7, 8].

На практике для стимуляции партеногенеза используют пыльцу, которая не способна произвести нормальное двойное оплодотворение. Выход гаплоидов при этом может достигать 20–50% от числа опыленных цветков [9–12].

В целом ряде работ обосновывается возможность получения высокогомозиготных диплоидов через псевдодиплоидный апомиксис, связанный со спонтанным удвоением

числа хромосом при первом делении ядра партеногенетически развивающейся гаплоидной яйцеклетки, не сопровождающимся цитокинезом [13].

Успешное использование апомиксиса в создании чистых линий у однолетних культур и ведущиеся в этом направлении эксперименты по плодовым за рубежом послужили причиной для развертывания соответствующих исследований в ГНУ ВНИИСПК.

**Методика.** Исходным материалом для исследований *in vitro* служили плодики растений из семейств Белорусская поздняя × Хеномелес японский и 9-61-65 (Лимонка × Ильинка) × Хеномелес японский в возрасте 55 и 70 дней с момента опыления. В каждой семье отбирали по 10 плодиков. Их стерилизацию проводили по схеме: 1) 1 час в проточной воде; 2) 15 мин. в 0,01% р-ре мертиолята; 3) 3-х кратное промывание в стерильной дистиллированной воде по 10 минут. Перед извлечением семян с зародышами плодики обжигали в пламени 96° этилового спирта в асептических условиях бокса.

Семена, а затем извлеченные из них зародыши (после 2 месяцев хранения в условиях пониженных температур, +3, +5°C) высевали на среду Смирнова, дополненную тиаминном 10 мг/л, дрожжевым экстрактом – 20 мл/л (по Р.Г. Бутенко, 1964), гидролизатом казеина – 400 мг/л, ГК – 2 мг/л, кинетином – 0,2 мг/л, мезоинозитом – 150 мг/л, сахарозой – 4%. Размножение апомиктических зародышей проводили на среде Мурасиге-Скуга. Пассированные зародыши культивировали при температуре 24–26°C, освещенности 3,0–3,5 тыс. лк. и 16-часовом фотопериоде.

Фиксацию меристематических верхушек для цитологического анализа проводили в уксусном спирте (3 части 96% этилового спирта + 1 часть ледяной уксусной кислоты).

Цитологический анализ мери-

стем *in vitro* проводили сотрудники лаборатории цитозембриологии ГНУ ВНИИСПК на временных давленных препаратах.

**Результаты исследований и их обсуждение.** На первом этапе исследований [14, 15, 16, 17] было установлено, что значительная часть сортов груши (более 50%) из использованных в опыте при несостоявшейся отдаленной гибридизации с представителями других родов подсемейства *Romoideae* способна образовывать семена апомиктического происхождения, дающие в большинстве случаев начало диплоидным растениям. Их количество в сильной степени зависит от генотипических особенностей материнского растения и в отдельных комбинациях может достигать 25% от числа опыленных цветков.

В результате изучения проявления стимулятивного апомиксиса у 80 сортов груши различного генетического происхождения выделены генотипы с высокой склонностью к апомиксису: 29-4, 40-4, Бретфелпс, 24-50-98, 24-59-255, Белорусская поздняя, Майкопская красавица, Дружба и другие. Показано, что некоторые апомиктические сеянцы в такой же степени склонны к апомиксису, как и материнские растения.

При стимуляции апомиксиса у груши с помощью пыльцы ирги, айвы обыкновенной и хеномелеса японского образование семян происходило в 50% случаев, а пыльцой яблони – в 30%. При использовании пыльцы хеномелеса японского идентификация апомиктических и гибридных сеянцев возможна на ранних этапах онтогенеза по маркерным признакам (у гибридных растений уже в фазе первых 2–3 настоящих листьев хорошо просматриваются крупные почковидные прилистники, а у апомиктических – прилистники шиловидные). В связи с этим применение пыльцы хеномелеса японского более предпочтительно.

Апомиктическим сеянцам груши, полученным в результате чужеродного опыления, в пределах одной и той же комбинации присуще большое морфологическое разнообразие. Эти различия затрагивают признаки листьев, побегов, габитуса растений, признаки плодов, устойчивости к болезням и другие. В плодоносящем состоянии апомикты, происходящие от одного материнского растения, отличаются друг от друга (и соответственно от материнского растения) в той же степени, что и гибридные сеянцы одной семьи.

Для выяснения причин столь высокой морфологической неоднородности у гетерозиготного по гену С (красная окраска листьев, плодов) сеянца груши при стимуляции пыльцой хеномелеса японского было получено апомиктическое потомство, состоящее из 2 типов растений: одни были с зелеными, другие – с пурпурными листьями. Таким образом, с использованием генетических маркеров по расщеплению, в потомстве было установлено, что начало апомиктическим семенам дают зародышевые мешки, в которых состоялся мейоз. Если бы это было не так, то все сеянцы были бы пурпурными. Практически все растения имели диплоидный набор хромосом, и только одно было гаплоидом.

Появление гаплоидов и диплоидов в потомствах сортов груши обусловлено одним и тем же процессом, оканчивающимся на разных этапах. В первом случае гаплоидная яйцеклетка приступает к делению и дает начало гаплоидному растению. Во втором восстановление диплоидности происходит в результате первого деления партеногенетически развивающейся гаплоидной яйцеклетки не сопровождающегося цитокинезом. В этом случае сразу же получается удвоенный гаплоид, представляющий собой полностью гомозиготное растение [18–21]. В настоящее время в селекционных

садах института имеются плодоносящие апомиктические растения груши.

На втором этапе, с целью увеличения выхода гаплоидов недозрелые апомиктические семена извлекались из 55–70-дневных плодиков и выращивались в культуре *in vitro*. В этот период, как известно, зародыши семечковых культур полностью сформированы и дифференцированы.

Количество зародышей, извлеченных из выполненных семян, оказалось в 1,6–2,8 раза меньше, чем общее число семян. В среднем они были от 1 до 5 мм длиной, имели белую, зеленоватую окраску, или были прозрачными. Семена, в которых не обнаружены зародыши, были заполнены прозрачным желеобразным эндоспермом. Зародыши, извлеченные из щуплых семян, размером до 2 мм, прозрачные и при культивировании на питательной среде погибали.

Независимо от возраста зародышей за 45-дневный период культивирования наблюдали отклонения в их развитии. Установлено, что количество проростков одновременно с аномалиями побегов и корней может достигать 50%. Проростки без аномалий достигали в высоту от 5 до 20 мм, количество листочков от 2 до 8 штук, а длина корешков – от 6 до 33 мм. В нестерильных условиях подобные проростки погибали. В связи с чем в дальнейшем их необходимо было размножить.

Апикальное доминирование на этапе микроразмножения снимали введением в питательную среду 6-БАП. Наибольшее индуцирование побегов достигалось чередованием концентраций цитокинина в дозе 1 мг/л и 2 мг/л на фоне 1,5 мг/л ГК. Подобное чередование 6-бензиламинопурина стимулировало образование и рост дополнительных почек и побегов (рис. 1).

На этапе укоренения апомиктических побегов более эффективным оказалось добавление в среду ИУК



**Рис. 1. Апомиктический номер 1 на этапе микроразмножения.**



**Рис. 2. Апомиктические микропобеги номера 5 на этапе ризогенеза.**

в количестве 1 мг/л. Укореняемость микропобегов достигала 80–87% (рис. 2).

Наиболее сложный этап клонального микроразмножения апомиктических растений груши – переход растений из *in vitro* в *in vivo*. Использование общепринятой технологии адаптации укоренённых микропобегов к почвенным условиям дает всего 50,5% прижившихся растений.

Чтобы повысить выход растений использовали прививку побегов *in vitro* на нестерильные подвои груши обыкновенной. Прививку проводили в период активного роста подвоя на зеленую часть растущего побега в расщеп. Прививка на подвои, выращенные в открытом грунте и пересаженные в условия искусственного освещения, результативна до 54%, а прививка на под-

вои, выращенные в условиях искусственного освещения, достигает 80%.

Цитологически было изучено 6 образцов из комбинации Белорусская поздняя х Хеномелес японский – №№ 8,10,12,16,17 и 22 и три образца из комбинации 9-61-65 х Хеномелес японский – №№ 1,5,7. У каждого образца анализировали от 1 до 38 верхушечных меристем. Большинство образцов в соматических клетках имеют диплоидный набор хромосом ( $2n=2x=34$ ). И лишь в двух образцах – №№ 1 и 8 – в отдельных точках роста отмечено наличие метафазных пластинок с числом хромосом, равным 17, т. е. гаплоидным. Следует отметить, что у образца № 1 гаплоидный набор хромосом отмечен в эпидермальных клетках.

У образца № 8 в двух случаях в меристематических клетках только метафазы с 17 хромосомами, а в двух как гаплоидные метафазы, так и диплоидные. По всей вероятности, два последних образца являются химерами, что может свидетельствовать о том, что процесс удвоения хромосом у гаплоидного растения может происходить спонтанно. Кроме того, в большинстве микропобегов образца № 8 отмечено много уродливых замыкающих клеток устьиц, что в свою очередь, свидетельствует о нарушении процесса дифференциации тканей вследствие несбалансированного набора хромосом.

Таким образом, цитологический анализ образцов апомиктических форм подтверждает наличие у груши стимулятивного гаплоидного партеногенеза и принципиальную возможность получения гаплоидов.

В настоящее время апомиктические номера, имеющие гаплоидный набор хромосом (№ 8, № 1), размножены, что открывает возможность для экспериментов по получению полностью гомозиготных растений и использованию их в селекционном процессе.

**Выводы.** Более 50% сортов груши из использованных в опыте при опылении пыльцой отдаленных родов подсемейства *Pomoideae* способны образовывать семена апомиктического происхождения, дающие в большинстве случаев начало диплоидным растениям.

Опыление груши пыльцой ирги, айвы обыкновенной и хеномелеса японского вызывало образование апомиктических семян в 50% случаев, а пыльцой яблони – в 30%. При этом в комбинациях с хеномелесом японским была возможна иденти-

фикация апомиктических и гибридных сеянцев на ранних этапах онтогенеза по маркерным признакам, в связи с чем использование пыльцы хеномелеса японского более предпочтительно.

Апомиктическим сеянцам груши, полученным в результате чужеродного опыления, в пределах одной и той же комбинации присуще большое морфологическое разнообразие, обусловленное механизмом образования семян.

С использованием генетических маркеров было установлено, что

начало апомиктическим семенам дают зародышевые мешки, в которых состоялся мейоз, а апомиктические растения могут представлять собой удвоенные гаплоиды.

Использование культуры *in vitro* позволило получить два образца апомиктических миксоплоидных растений, содержащих как гаплоидные, так и диплоидные клетки и тиражировать их, что в перспективе даст возможность получить полностью гомозиготные растения для использования их в селекционном процессе.

### ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Навашин, М.С. Новая возможность в селекции / М.С. Навашин // Селекция и семеноводство. – 1933. – № 2. – С. 11–16.
2. Хохлов, С.С. Гаплоидия и селекция / С.С. Хохлов, В.С. Тырнов, Е.В. Гришина [и др.]. – М.: Наука, 1976. – 222 с.
3. Murahami, Y. Biotechnology of fruit trees / Y. Murahami // Farmg. Japan. – 1987. – Vol. 21, № 1. – P. 27–36.
4. Dayan Wang, Gao-lin Gui, Jang San Sun. Tissue culture of fruit crops in China // Hortscience. – 1988. – Vol. 23, № 6. – P. 962–965.
5. Hanre V. Nutzung biotechnologisches Verfahren für die Obstzucht // Landwirtschaftswissenschaft. – 1990. – № 292. – S. 193–199.
6. Жуков, О.С. Методические рекомендации по получению растений регенератов плодовых пород в культуре пыльников / О.С. Жуков, О.Я. Олейникова, Н.И. Савельев. – Мичуринск, 1994. – 36 с.
7. Lespinasse Y., Godicheau M., Duron M. Potential value and method of producing haploids in the apple tree *Malus pumila* Mill // Acta Horticulturae. – 1983. – Vol. 131. – P. 223–230.
8. Zhang J.X., Lespinasse Y., Chevreau E. Obtention de plantes haploides de pommier (*Malus domestica* Borkh) issues de parthenogenese induite in situ par du pollen irradie et culture in vitro des pepins immatures // C.r.Acad.sci. – 1988. – Vol. 307. – P. 451–457.
9. Laurie, D.A. The production of haploid wheat plants from wheat x maize cross / D.A. Laurie, M.D. Bennett // Theor.Appl. Genet. – 1988. – Vol. 76. – P. 393–397.
10. Inagaki M., Henry Y., Buysier J. Comparison of haploid production efficiency through anther culture and intergenetic crossing in three wheat varieties and their FI hybrids / Japan J. Breeding. – 1987. – Vol. 57. – № 4. – 474 p.
11. Suenaga K., Nakajime K. Efficient production through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*) / Plant Cell Reports. – 1989. – Vol. 8. – P. 263–266.
12. Чистякова, В.Н. Экспериментальная гаплоидия как средство интенсификации генетико-селекционных работ / В.Н. Чистякова, Э.Д. Неттевич, Т.В. Гуляев // Совершенствование селекционно-генетических процессов при выведении сортов зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземной зоне. – Москва, 1990. – С. 3–12.
13. Чистякова, В.Н. Метод ускоренного получения гомозиготных линий мягкой пшеницы и неполных 56 хромосомных пшенично-пырейных амфидиплоидов при внутривидовой гибридизации / В.Н. Чистякова. // Совершенствование селекционно-генетических методов при выведении сортов зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземной зоне. – М.: 1990. – С. 3–12.
14. Долматов, Е.А. Стимулятивный апомиксис и проблема получения гомозиготных растений у груши / Е.А. Долматов // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1996. – С. 11–123.
15. Долматов, Е.А. Апомиксис у груши и перспективы его использования / Е.А. Долматов. // На благо отечественного садоводства (150 лет Всероссийскому НИИ селекции плодовых культур). – Орел: «Тургеневский бережок», 1996. – С. 165–167.
16. Долматов, Е.А. Апомиксис и экспериментальная гаплоидия у груши / Е.А. Долматов, Н.И. Панова // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1998. – С. 276–280.
17. Долматов, Е.А. Изучение морфологической неоднородности апомиктического потомства груши / Е.А. Долматов, Е.Н. Седов, Н.И. Панова, Г.А. Седышева // Доклады РАСХН, – 1998. – № 4. – С. 15–16.