

УДК 634.11:576.3:581.33

**ХАРАКТЕРИСТИКА  
ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА  
ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ  
В СВЯЗИ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
В СЕЛЕКЦИИ**

Горбачева Наталья Геннадьевна  
канд. с.-х. наук  
старший научный сотрудник  
лаборатории цитоэмбриологии  
e-mail: gorbachevanata81@yandex.ru

*Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский  
институт селекции плодовых культур»,  
Орёл, Россия*

Наиболее эффективным методом создания большого гибридного фонда триплоидов яблони является скрещивание разнохромосомных форм типа диплоид x тетраплоид, тетраплоид x диплоид. Ограниченный набор тетраплоидных форм является лимитирующим фактором для этого направления селекции. Поэтому выделение и изучение новых тетраплоидных форм яблони является важной задачей, а систематический цитоэмбриологический контроль при этом – неперемное условие успешной результативной селекционной работы. Целью наших исследований был цитоэмбриологический анализ эмбриональных структур при формировании женского гаметофита у некоторых тетраплоидных форм яблони для использования их в селекции на полиплоидном уровне. Объектами для изучения состояния женской генеративной сферы послужили три тетраплоидные формы яблони: Мелба (4x), форма 30-47-88 и форма 25-37-47. Исследования проводились в лаборатории цитоэмбриологии ВНИИСПК. Особенности формирования семяпочек и зародышевых мешков растений яблони изучали на постоянных препаратах, приготовленных в соответствии с общепринятыми методами цитологического анализа. В данной статье

UDC 634.11:576.3:581.33

**CHARACTERISTIC  
OF FEMALE GAMETOPHYTE  
OF TETRAPLOID APPLE FORMS  
RELATIVE THEIR USING  
IN BREEDING**

Gorbacheva Nataliya  
Cand. Agr. Sci.  
Senior Research Associate  
of Laboratory of Cytoembriology  
e-mail: gorbachevanata81@yandex.ru

*Federal State Budgetary  
Scientific Institution  
"All Russian Research Institute  
of Fruit Crop Breeding",  
Orel, Russia*

The most effective way to create a great apple hybrid triploid fund is the crossing of different chromosome forms of diploid x tetraploid and tetraploid x diploid. A limited set of tetraploid forms is a limiting factor for this direction of breeding. Therefore, the identification and study of new tetraploid apple forms is an important task, and a systematic cytoembryological control is essential to the success of effective breeding work. The aim of our study was cytoembryological analysis of embryological structures in the formation of the female gametophyte in some tetraploid apple forms for their use in breeding at the polyploidy level. The object for study of the female generative sphere was three tetraploid apple forms: Melba (4x), form 30-47-88 and form 25-37-47. The study is carried out in the cytoembriological laboratory of the FSBSI "All Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding". Features of formation of ovules and embryonic bads of apple plants were studied on permanent preparations, prepared in accordance with generally accepted methods

приводится цитозембриологическая характеристика формирования женского гаметофита у изучаемых тетраплоидных форм яблони, включенных в качестве исходных форм в селекцию этой культуры на полиплоидном уровне. Результатами проведенного нами анализа показано, что тетраплоидные формы 25-37-47, 30-47-88, Мелба (4x) можно рекомендовать для использования в селекции яблони на полиплоидном уровне в качестве материнских исходных форм. Однако необходимо учитывать высокую самоплодность формы 30-47-88, определенную в специальных опытах, и при включении ее в интервалентные скрещивания в качестве матери необходимо производить кастрацию цветков для повышения выхода триплоидного гибридного потомства яблони.

*Ключевые слова:* ЯБЛОНЯ, ПОЛИПЛОИДИЯ, ТЕТРАПЛОИД, СЕМЯПОЧКА, АРХЕСПОРИЙ, ЗАРОДЫШЕВЫЙ МЕШОК

of cytological analysis. This article presents the cytoembryological characteristic of female gametophyte formation of the studied tetraploid apple forms included as initial forms in breeding of this crop at the polyploid level. It is shown by the results of the analysis that tetraploid forms of 25-37-47, 30-47-88, Melba (4x) can be recommended to use in breeding of apple on a polyploidy level as the original parent forms. However, the high self-pollination of 30-47-88 forms is determined in the special experiences, and when you include it in intervalence crossing as a mother it is necessary to make a castration of the flowers to increase in the yield of apple triploid hybrid posterity.

*Key words:* APPLE-TREE, POLYPLOIDY, TETRAPLOID, OVULE, ARCHESPORIUM, EMBRYO SAC.

**Введение.** Яблоня является одной из важнейших плодовых пород в зоне с умеренным климатом. Несомненный интерес для практического садоводства представляют триплоидные сорта яблони, которые обладают комплексом хозяйственно-ценных признаков: более крупные плоды, более регулярное плодоношение, лучшая товарность плодов, повышенная самоплодность, устойчивость к болезням и др. Эти сорта в значительной степени отвечают возрастающим требованиям рынка [1, 2, 3, 4, 5]. Получению таких сортов способствует целенаправленная селекция яблони на полиплоидном уровне с использованием тетраплоидных исходных форм – доноров диплоидных гамет. Наиболее эффективным методом создания большого гибридного фонда триплоидов яблони является скрещивание разнохромосомных форм типа диплоид x тетраплоид, тетраплоид x диплоид [7, 8, 9, 10]. Ограниченный набор тетраплоидных форм является лимитирующим фактором для этого направления селекции. Поэтому выделение и

изучение новых тетраплоидных форм яблони является важной задачей, а систематический цитоэмбриологический контроль при этом – неременное условие успешной результативной селекционной работы. Изучение особенностей генеративных структур у тетраплоидных форм дает возможность оценить их в качестве доноров диплоидных гамет, а селекционеру – подбирать наиболее рациональные комбинации скрещивания и в определенной мере прогнозировать и оценивать результаты этих скрещиваний.

Целью нашей работы было цитоэмбриологическое исследование эмбриональных структур при формировании женского гаметофита у некоторых тетраплоидных форм яблони для использования их в селекции на полиплоидном уровне.

**Объекты и методы исследований.** Объектами для изучения состояния женской генеративной сферы послужили три тетраплоидные формы яблони: Мелба (4x) получена в виде черенкового материала из Японии (Feni Research Station) через ВИР им. Н. И. Вавилова, и две новые тетраплоидные формы, полученные во ВНИИСПК в процессе реализации программы по селекции яблони на полиплоидном уровне, – форма 30-47-88 [Либерти × 13-6-106 (сеянец сорта Суворовец)] (4x) и форма 25-37-47 (SR0523 × Антоновка плоская) (4x). Все три формы являются гомогенными тетраплоидами. Тетраплоид 30-47-88 имеет в своем генотипе ген иммунитета к парше Vf, а форма 25-37-47 – ген Vm.

Исследования проводились в лаборатории цитоэмбриологии ВНИИСПК. Особенности формирования семязпочек и зародышевых мешков изучали на постоянных препаратах, приготовленных в соответствии с общепринятыми методами [11, 12]. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Nikon 50i при увеличении 10 x 1,5 x 40; 10 x 1,5 x 100. Фотографии сделаны фотокамерой DS-Fi1.

**Обсуждение результатов.** Изучение эмбриональных структур женской генеративной сферы тетраплоидных форм яблони показало, что схема

развития женского гаметофита у них примерно одинакова. Однако в большинстве случаев для каждой из изучаемых форм характерны какие-то свои отличительные особенности на том или ином этапе развития генеративных структур, которые в итоге и определяют их ценность для использования в селекции. Весной формируются анатропные с овальным нуцеллусом и двумя интегументами семяпочки (рис. 1 а). В нуцеллусе закладывается материнская клетка макроспор (рис. 1 б), в дальнейшем развивается тетрада (рис. 1 в), а затем зародышевый мешок: вначале двух-, далее четырех-, и наконец, восьмиядерный (рис. 1 г, д, е). Археспорий многоклеточный.

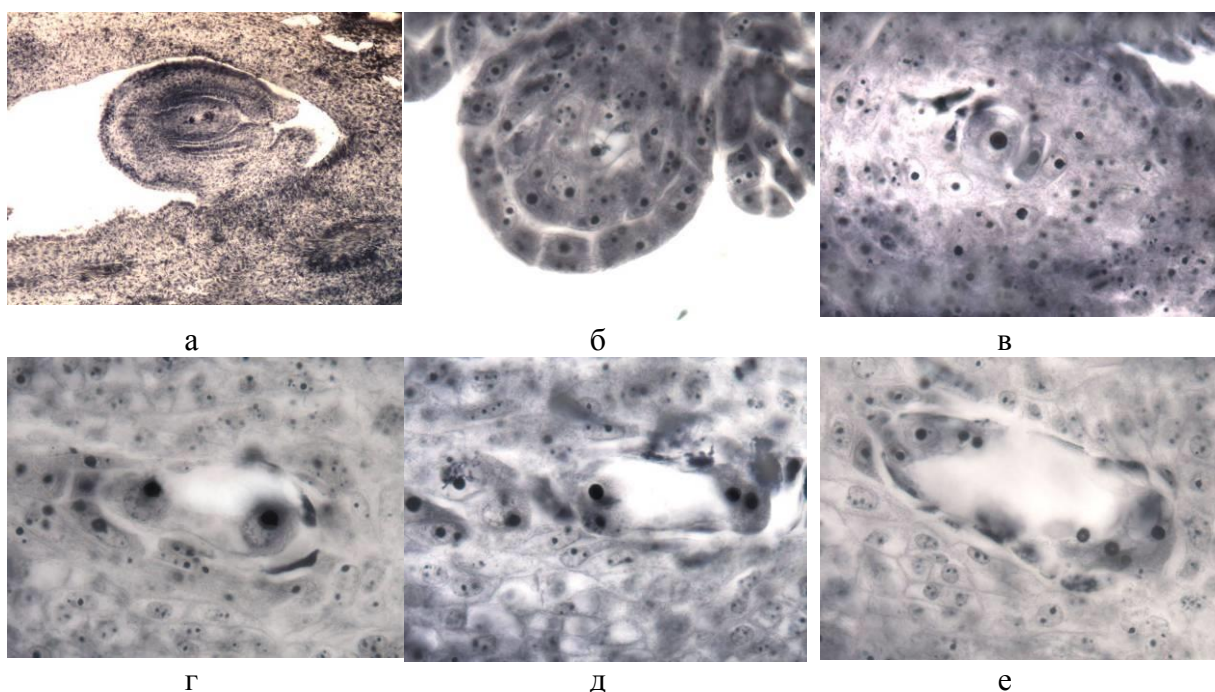


Рис. 1. Формирование женского гаметофита у тетраплоидных форм яблони  
а – нормальная семяпочка, Мелба (4х); б – материнская клетка макроспор, 30-47-88;  
в – линейная тетрада, 30-47-88; г – двухъядерный зародышевый мешок, Мелба (4х);  
д – четырехъядерный зародышевый мешок, Мелба (4х);  
е – восьмиядерный зародышевый мешок, 30-47-88

Тетрады могут быть с линейным, Т-образным и квадратным расположением макроспор. Расположение макроспор в тетраде зависит от направления оси деления клеток макроспор в диаде. Если оси деления веретен в обеих клетках диады параллельны продольной оси семяпочки, то расположение макроспор будет преимущественно линейным. Если оси фигур деления взаимно перпендикулярны, то расположение макроспор – Т-образное и



т. д. У форм 30-47-88 и 25-37-45 преобладают линейные тетрады – 42,8 % и 63,1 %, а у сорта Мелба (4х) – квадратные и Т-образные (80 %).

Некоторые семязпочки имели по две или три тетрады макроспор, в результате этого вполне могли бы сформироваться дополнительные зародышевые мешки. Однако нами были выявлены лишь единичные случаи формирования двух зародышевых мешков в одном нуцеллусе – у сорта Мелба (4х) и формы 30-47-88. В начале развития зародышевого мешка активность клеток дополнительных тетрад и археспория постепенно затухает, и они подвергаются деструкции. Остатки разрушающихся тетрад наблюдали в виде черных комочков-сгустков, находящихся над развивающейся макроспорой, даже на стадии четырех и восьмиядерных зародышевых мешков.

Строение зародышевого мешка в большинстве случаев нормальное, типичное для представителей Rosaceae. В микропилярном конце зародышевого мешка три клетки дифференцированы морфологически и функционально по-разному. Они образуют яйцевой комплекс, в котором центральное положение занимает яйцеклетка – женская гамета, а по обе стороны, прикрывая ее, две клетки спутницы – синергиды (рис. 2 а, б). Вблизи яйцевого аппарата находятся полярные ядра. В халазальном конце зародышевого мешка располагаются три клетки антиподы, как правило, ядра у них мельче, чем у других элементов зародышевого мешка (рис. 2 в)

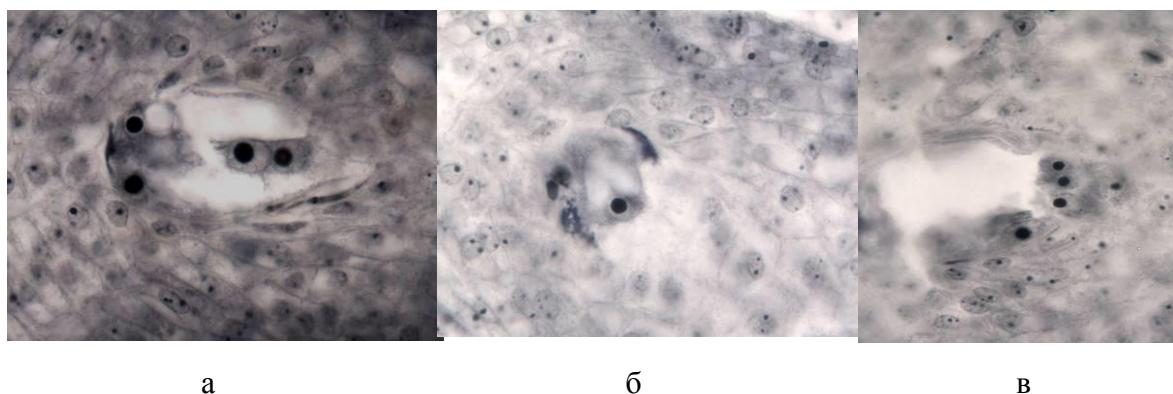


Рис. 2. Нормальный зародышевый мешок, 30-47-88  
(последовательные срезы одного и того же зародышевого мешка)  
а – две клетки синергиды, полярные ядра; б – яйцеклетка; в – антиподы.

Некоторые нарушения в период формирования зародышевого мешка наблюдали у всех тетраплоидов яблони: наличие дополнительных тетрад (рис. 3 а), дифференциация всех клеток яйцевого аппарата или антипод по типу синергид (рис. 3 б, в), присутствие сверхчисленных ядер в зародышевом мешке (рис. 3 г) и др. (табл.).

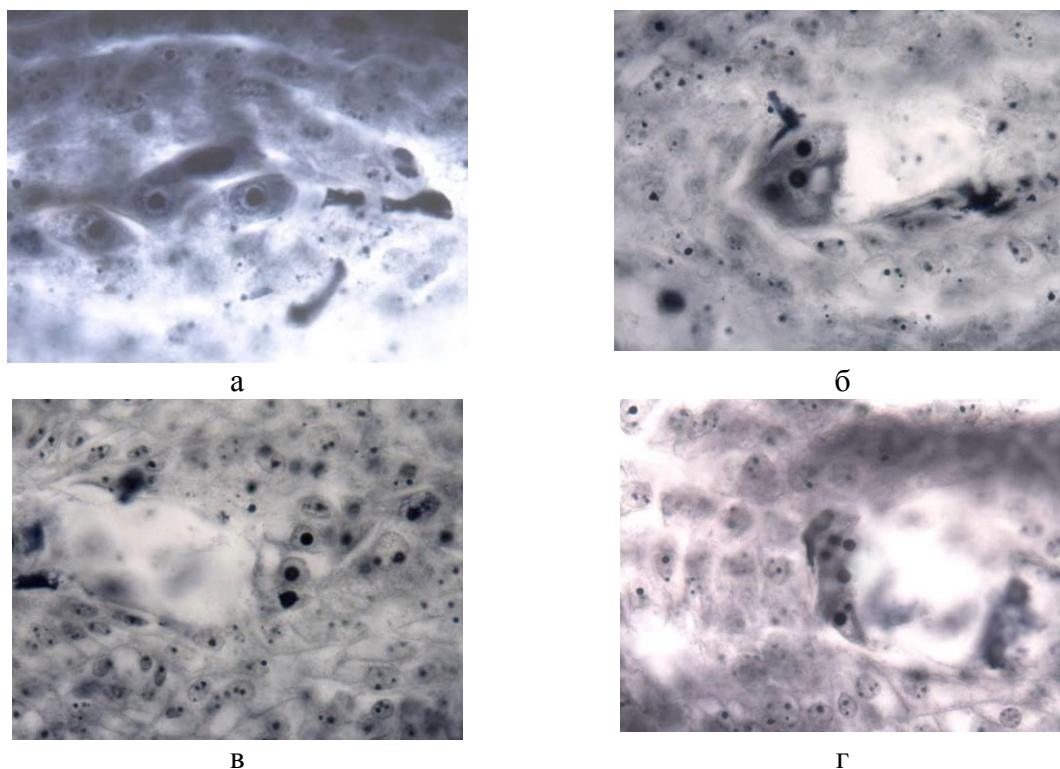


Рис. 3. Особенности формирования женского гаметофита

а – две тетрады в одной семяпочке, Мелба (4х); б – дифференциация клеток яйцевого аппарата по типу синергид, Мелба (4х); в – дифференциация антипод по типу синергид, Мелба (4х); г – пять ядер в халазальном конце зародышевого мешка, 30-47-88

Минимальный уровень аномальных зародышевых мешков (21,9 %) и семяпочек (2,9 %) – у формы 25-37-47. У сорта Мелба (4х) процент зародышевых мешков с отклонениями чуть больше (26 %), аномальных семяпочек отмечено не было. Наибольшее количество отклонений у формы 30-47-88 – 27,8% аномальных зародышевых мешков и 21,5% аномальных семяпочек (сложные семяпочки (рис. 4 а), сидячие семяпочки, семяпочки с одним интегументом (рис. 4 б), семяпочки с длинными интегументами).

## Типы нарушений женской генеративной сферы у тетраплоидных форм яблони

Форма	Типы нарушений	% аномальных зародышевых мешков	% аномальных семяпочек
30-47-88	Сверхчисленные тетрады, дополнительные зародышевые мешки, асинхронность деления в тетраде, дифференциация клеток яйцевого аппарата по типу синергид, дифференциация клеток антипод по типу синергид, сверхчисленные ядра в зародышевом мешке, размещение зародышевого мешка глубоко в нуцеллусе, дегенерация генеративной ткани зародышевого мешка, сложные семяпочки, сидячие семяпочки, семяпочки с одним интегументом, семяпочки с длинными интегументами	27,8	21,5
Мелба (4x)	Сверхчисленные тетрады, дополнительные зародышевые мешки, сверхчисленные ядра в зародышевом мешке, асинхронность развития ядер в зародышевом мешке, дифференциация клеток антипод по типу синергид, дегенерация генеративной ткани	26,0	0
25-37-47	Сверхчисленные тетрады, дополнительные зародышевые мешки, дифференциация клеток яйцевого аппарата по типу синергид, дифференциация клеток антипод по типу синергид, сверхчисленные ядра в зародышевом мешке, дегенерация генеративной ткани, сидячие семяпочки, семяпочки с недоразвитыми интегументами	21,9	2,9

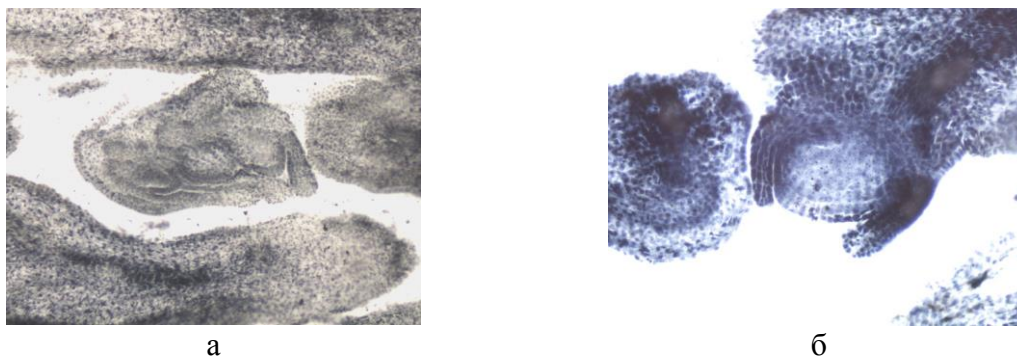


Рис. 4. Аномалии в развитии зародышевых мешков и семяпочек  
а – сложная семяпочка с тремя нуцеллусами, 30-47-88,  
б – сидячая семяпочка с одним интегументом, 30-47-88

**Заключение.** Перечисленные аномалии женского гаметофита у тетраплоидных форм яблони в большинстве случаев не препятствуют осуществлению двойного оплодотворения, а лишь подчеркивают их сортоспецифичность. И в более чем 70 % случаев у изученных форм формируются нормальные зародышевые мешки Polypom-типа готовые к оплодотворению. Следовательно тетраплоидные формы 25-37-47, 30-47-88, Мелба (4x) можно рекомендовать для использования в селекции на полиплоидном уровне в качестве материнских исходных форм. Однако необходимо учитывать высокую самоплодность формы 30-47-88, определенную в специальных опытах, и при включении ее в интервалентные скрещивания в качестве матери необходимо производить кастрацию цветков для повышения выхода триплоидного гибридного потомства.

#### Литература

1. Седов, Е.Н. Новые иммунные / Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова // Приусадебное хозяйство. – 2005. – № 12. – С. 46-47.
2. Седов, Е.Н. Инновации в изменении генома яблони. Новые перспективы в селекции / Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, М.А. Макаркина [и др.]. – Орел: ВНИИСПК, 2015. – 336 с.
3. Бученков, И. Э. Создание исходного материала плодово-ягодных культур на основе полиплоидии / И.Э. Бученков, В.Н. Кавцевич, Г.А. Бавтуто // Агрэкология. Экологические основы плодoовощеводства: сб. науч. тр., вып. 2. – Горки, 2005. – С. 17-20.
4. Седов, Е.Н. Первые иммунные к парше триплоидные сорта яблони / Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова, Н.Г. Горбачева // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2015. – № 6. – С. 37-41.



5. Singh R. Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill) / R. Singh, B. A. Wafai // *Euphytica*, 1984. – V. 33. - № 1. – P. 209-214.
6. Barletta M. «Yupiter» - eine pramierte britische Apfelsorte / M. Barletta // *Erwerbsobstbau*. – 1988. – 30. 4. – P. 113-115.
7. Седов, Е.Н. Селекция и новые сорта яблони / Е.Н. Седов. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 624 с.
8. Nilsson – Ehle, H. Further work on the production of tetraploid apples / H. Nilsson – Ehle // *Sverig. Pomol. Arsskr.*, 1942. – V. 43. – P. 25-28.
9. Nilsson-Ehle, H. Some new information about tetraploid apple varieties and their use and role in breeding of fruit trees / H. Nilsson-Ehle // *Sverig. Pomol. Asskr.*, 1944., – V. 45. – P. 229-237.
10. Седышева, Г.А. Эффективность гетероплоидных скрещиваний в роде MALUS MILL и цитологический контроль при создании триплоидных сортов / Г.А. Седышева, Е.Н. Седов, Н.Г. Горбачева, З.М. Серова, С.А. Мельник // *Современное садоводство*. – 2017. – № 1 (21). – С. 6-11.
11. Рыбин, В.А. Цитологический метод в селекции плодовых / В.А. Рыбин – М.: Колос, 1967. – 216 с.
12. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1980. – 304 с.

#### References

1. Sedov, E.N. Novye immunnye / E.N. Sedov, G.A. Sedysheva, Z.M. Serova // *Priusadebnoe hozjajstvo*. – 2005. – № 12. – S. 46-47.
2. Sedov, E.N. Innovacii v izmenenii genoma jabloni. Novye perspektivy v selekcii / E.N. Sedov, G.A. Sedysheva, M.A. Makarkina [i dr.]. – Орел: ВНИИСПК, 2015. – 336 с.
3. Buchenkov, I. Je. Sozdanie ishodnogo materiala plodovo-jagodnyh kul'tur na osnove poliploidii / I.Je. Buchenkov, V.N. Kavcevich, G.A. Bavtuto // *Agrojekologija. Jekologicheskie osnovy plodoovoshhevodstva: sb. nauch. tr., vyp. 2.* – Gorki, 2005. – S. 17-20.
4. Sedov, E.N. Pervye immunnye k parshe triploidnye sorta jabloni / E.N. Sedov, G.A. Sedysheva, Z.M. Serova, N.G. Gorbacheva // *Vestnik rossijskoj sel'skohozjajstvennoj nauki*. – 2015. – № 6. – S. 37-41.
5. Singh R. Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill) / R. Singh, B. A. Wafai // *Euphytica*, 1984. – V. 33. - № 1. – P. 209-214.
6. Barletta M. «Yupiter» - eine pramierte britische Apfelsorte / M. Barletta // *Erwerbsobstbau*. – 1988. – 30. 4. – R. 113-115.
7. Sedov, E.N. Selekcija i novye sorta jabloni / E.N. Sedov. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 624 с.
8. Nilsson – Ehle, H. Further work on the production of tetraploid apples / H. Nilsson – Ehle // *Sverig. Pomol. Arsskr.*, 1942. – V. 43. – P. 25-28.
9. Nilsson-Ehle, H. Some new information about tetraploid apple varieties and their use and role in breeding of fruit trees / H. Nilsson-Ehle // *Sverig. Pomol. Asskr.*, 1944., – V. 45. – P. 229-237.
10. Sedysheva, G.A. Jeffektivnost' geteroploidnyh skreshhivaniy v rode MALUS MILL i citologicheskij kontrol' pri sozdanii triploidnyh sortov / G.A. Sedysheva, E.N. Sedov, N.G. Gorbacheva, Z.M. Serova, S.A. Mel'nik // *Sovremennoe sadovodstvo*. – 2017. – № 1 (21). – S. 6-11.
11. Rybin, V.A. Citologicheskij metod v selekcii plodovyh / V.A. Rybin – М.: Колос, 1967. – 216 с.
12. Pausheva, Z.P. Praktikum po citologii rastenij / Z.P. Pausheva. – М.: Колос, 1980. – 304 с.