

ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ФОРМ РОДА *Cerasus* Mill. ПРИ ОТДАЛЕННЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ В СВЯЗИ С СЕЛЕКЦИЕЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КОККОМИКОЗУ*

А.П. КУЗНЕЦОВА, Г.К. КИСЕЛЁВА

Вредоносное грибное заболевание коккомикоз приводит к преждевременному опадению листьев, ослаблению деревьев, снижению урожайности, ухудшению зимостойкости. Наиболее вирулентная популяция возбудителя заболевания обнаружена в Краснодарском крае. В Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства скрещивали слабопоражаемые сорта вишни и черешни с иммунными к коккомикозу образцами восточноазиатских видов — *Cerasus lannesiana* № 2, *C. serrulata* Hally Tolivetta, *C. subhirtella* Pendula. Проводили сравнительные цитоэмбриологические исследования в различных комбинациях скрещиваний. Определяли fertильность пыльцы, изучали рост пыльцевых трубок в тканях пестика, следили за развитием зародышей. Наиболее совместимыми комбинациями скрещивания в программной стадии оплодотворения оказались Норд Стар × *C. subhirtella* Pendula, Норд Стар × 3-116 (соянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф). Нарушения в развитии гибридных зародышей начинали проявляться спустя 18-25 сут после опыления (на стадии сердечка). В этот период целесообразно выделять зародыши для их дормации *in vitro* с целью преодоления постгамной несовместимости.

Ключевые слова: несовместимость, *Cerasus* Mill., коккомикоз, *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx, пыльцевые трубы, гибридные зародыши.

Keywords: incompatibility, *Cerasus* Mill., *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx, fertilization tube, hybrid germ.

Несмотря на высокую значимость вишни и черешни в современном плодоводстве, площади под этими культурами постоянно сокращаются, сортимент уменьшается. Одна из главных причин — развитие коккомикоза. Это вредоносное заболевание, вызываемое грибом *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx (syn. *Coccotyces hietalis* Higgins). Болезнь приводит к преждевременному опадению листьев, а значит, к ослаблению деревьев, снижению урожайности, ухудшению зимостойкости. В отдельные годы растения бывают поражены на 80-100 % (1-3). В настоящее время в питомниках из-за эпифитотийного развития коккомикоза резко уменьшилось число семенных подвойных форм, особенно для вишни. Даже при наличии достаточного количества семян не удается вырастить стандартные подвои, поскольку необходимое загущенное расположение сеянцев в школке ведет к массовому поражению коккомикозом, ослаблению роста, невызреванию подвоев или полной гибели растений (4, 5). За последнее десятилетие в связи с изменением погодно-климатических условий усилилась вредоносность коккомикоза. В Краснодарском крае эпифитотическое развитие болезни прогрессирует из-за наличия у гриба сумчатой и конидиальной стадий. Число генераций коккомикоза достигает 10, что создает высокий инфекционный фон. Быстро преодолеваются механизмы устойчивости, которые контролируются только одним геном. При изучении популяций возбудителя коккомикоза с разных экологического-географических территорий наиболее вирулентная выявлена в Краснодарском крае (6).

Среди основного сортового материала вишни и черешни иммунных форм не найдено (7-9). Источниками иммунитета к коккомикозу служат только дикие формы рода *Cerasus* Mill. Отдаленная гибридизация —

* Поддержано грантами р_юг_a № 09-04-96601, р_офи № 09-04-99142 РФФИ и администрации Краснодарского края.

эффективный способ получения устойчивых форм.

В Северо-Кавказском зональном научно-исследовательском институте садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ) проводятся скрещивания слабопоражаемых сортов вишни и черешни с иммунными к коккомикозу образцами восточноазиатских видов (*C. lannesiana* № 2, *C. serrulata* Hally Tolivetta, *C. subhirtella* Pendula), которые в 1984-1985 годы выделялись как иммунные при заражении 77 изолятами патогена из разных районов страны. В условиях Краснодарского края с 1985 года признаки поражения болезнью не обнаружены ни у них самих, ни у образцов от их дериватов, источниками иммунитета для которых служили материнские формы. Производные от вишни Маака в условиях Краснодарского края поражаются коккомикозом (ЛЦ-52, Алмаз, Рубин и др.) (7, 10).

При отдаленной (межвидовой) гибридизации мы столкнулись с проблемой несовместимости, которая проявляется в нескрещиваемости исходных форм, опадении завязей, низкой завязываемости плодов, неполноценности семян у полученных гибридов. Она может возникать на разных этапах развития растения, начиная с непрорастания пыльцы на рыльце пестика и заканчивая образованием семени с неполнценным зародышем. Изучение несовместимости важно для теоретической и практической селекции, поскольку успех в создании новых сортов обеспечивается правильным использованием наследственного потенциала исходных родительских форм, разработкой методов преодоления нескрещиваемости и нежизнеспособности гибридных зародышей и растений.

Целью нашей работы было выявление цитоэмбриологических причин несовместимости в роде *Cerasus* Mill., а также выделение наиболее совместимых комбинаций скрещиваний, которые впоследствии могут быть рекомендованы для селекции на устойчивость к коккомикозу.

Методика. Объектом исследований послужили следующие комбинации скрещиваний сортов и форм: Норд Стар × *C. lannesiana* № 2, Норд Стар × *C. subhirtella* Pendula, Норд Стар × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), Норд Стар × 3-112 (соянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Норд Стар × 3-116 (соянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), Любская × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), (Студенческая × *C. lannesiana* № 2) × Франц Иосиф, (*C. lannesiana* № 2 × Студенческая) × Франц Иосиф. Гибридизацию проводили 10, 11, 14 и 15 апреля 2008 года на опытном участке СКЗНИИСиВ (Краснодарский край).

Материал для цитоэмбриологических исследований собирали ежедневно, а после видимого завязывания плодов каждые 3 сут. Для анализируемой комбинации скрещиваний фиксировали по 10 цветков или завязей. В качестве фиксатора использовали уксусный спирт (1:3). Искусственное проращивание пыльцы проводили методом Д.А. Гранковского (13). Фертильность пыльцы определяли ацетокарминовым методом (13). Изучали рост пыльцевых трубок в тканях пестика. Столбики пестиков разрезали вдоль на две половинки и рассматривали отдельно. Семяпочки раздавливали, зародыши выделяли и окрашивали ацетокармином (14). В исследованиях использовали микроскоп Olympus BX4 («Olympus corporation», Япония) и стереоскопический микроскоп МБС-2 («ЛОМО», СССР).

Результаты. Жизнеспособность пыльцы составляла от 23,6 до 49,5 %. Ее успешное проращивание на искусственной питательной среде (18 % раствор сахарозы) подтвердило, что пыльца, используемая для гибридизации, жизнеспособна. Фертильность пыльцевых зерен варьировала от 63,0 до 85,0 % (табл. 1, рис. 1).

1. Результаты качественного анализа пыльцы, используемой при гибридизации между представителями рода *Cerasus* Mill. (опытный участок Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства, Краснодарский край, 2008 год)

Вид, сорт, гибрид	Жизнеспособность, %	Фертильность, %
<i>C. lannesiana</i> № 2	48,6	74,2
<i>C. subhirtella Pendula</i>	40,1	72,3
<i>C. lannesiana</i> № 2 × Франц Иосиф	49,5	63,0
3-112 (саянец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка)	23,6	85,0
3-116 (саянец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка)	36,7	62,1
Франц Иосиф	34,3	81,3

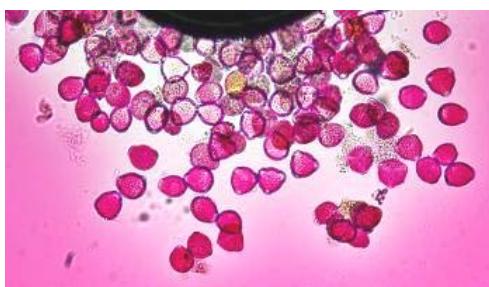


Рис. 1. Фертильность пыльцевых зерен у гибрида *Cerasus lannesiana* № 2 × сорт Франц Иосиф, выявленная при окрашивании ацетокармином (неокрашенные зерна стерильны). Увеличение ×100 (опытный участок Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства, Краснодарский край, 2008 год).

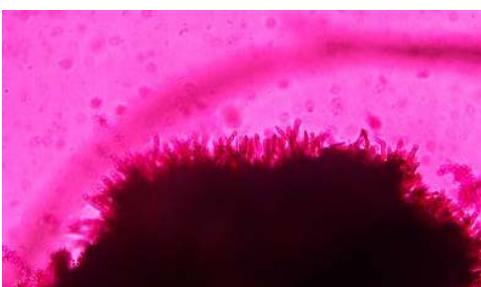


Рис. 2. Рыльце у вишни сорта Норд Стар, покрытое многочисленными папиллами (окрашивание ацетокармином. Увеличение ×100 (опытный участок Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства, Краснодарский край, 2008 год).

Рыльце у вишни было покрыто многочисленными папиллами (рис. 2). Пыльцевые трубы росли сначала по папиллам рыльца, затем — по межклеточным пространствам в верхней части столбика и в канале стилодия по поверхности выстилающих его клеток секреторной природы. Програмная несовместимость в изученных комбинациях проявлялась прежде всего в неодинаковой интенсивности прорастания пыльцы на рыльце и ингибировании роста пыльцевых трубок в пестике, причем последнее служило решающим фактором.

В комбинациях скрещиваний Норд Стар × *C. lannesiana* № 2, Норд Стар × *C. subhirtella Pendula*, Норд Стар × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), Норд Стар × 3-112 (саянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф) пыльцевые зерна хорошо прорастали на рыльцах. Пыльцевые трубы широким пучком внедрялись в канал стилодия и достигали завязи. В комбинациях Норд Стар × 3-116 (саянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Любская × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф) отмечалось плохое прорастание пыльцы на рыльце, меньшее число пыльцевых трубок в столбиках, замедленный рост и морфологические отклонения от нормы (вздутия на концах пыльцевых трубок, образование каллозных пробок). Блокировка роста пыльцевых трубок происходила в основном в стилодиях пестика. По-видимому, здесь действовал механизм несовместимости, кодируемый геном несовместимости и приводящий к остановке роста несовместимых пыльцевых трубок. Следует отметить, что пыльцевые трубы достигали завязи примерно на 2 сут позже, чем в предыдущих комбинациях скрещиваний.

В комбинациях (Студенческая × *C. lannesiana* № 2) × Франц Иосиф и (*C. lannesiana* № 2 × Студенческая) × Франц Иосиф наблюдалась полная несовместимость пыльцы и пестика: мы не обнаружили ни одной пыльцевой трубки. Непроросшие пыльцевые зерна остались на поверхности рыльца и постепенно дегенерировали. На 5-е сут после опыления все неоплодотворенные завязи опали, гибридных семян получить не удалось. То есть барьер несовместимости появлялся в программной фазе оплодотворения при прорастании пыльцы.

Анализируя полученные результаты, можно сделать предварительные прогнозы по завязываемости плодов и семян и исключить комбинации, порог несовместимости которых приходится на программную фазу оплодотворения. Необходимо также учитывать, что несовместимость проявляется на любой стадии развития зародыша и семени. Даже проростки гибридных семян могут погибнуть на начальных этапах развития.

В наших исследованиях наиболее выравненные темпы развития зародышей отмечены в следующих комбинациях скрещиваний: Норд Стар × *C. subhirtella Pendula*, Норд Стар × 3-116 (сейнец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф). В этих вариантах на 10-17-е сут после опыления основная масса зародышей находилась на шаровидной стадии, на 18-25-е сут — на стадии сердечка, на 26-29-е сут — на стадии торпеды, к 30-35-м сут наблюдали полностью дифференцированные зародыши (табл. 2).

2. Доля (%) гибридных зародышей, полученных в различных комбинациях скрещиваний между представителями рода *Cerasus* Mill., и стадия их развития в зависимости от времени после опыления (опытный участок Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства, Краснодарский край, 2008 год)

Комбинация скрещивания сортов, форм	Срок после опыления, сут															
	10-17				18-25				26-29				30-35			
	Ш	С	Т	Д	Ш	С	Т	Д	Ш	С	Т	Д	Ш	С	Т	Д
Норд Стар × <i>C. lannesiana</i> № 2	97	3	0	0	22	78	0	0	0	42	58	0	0	0	47	53
Норд Стар × <i>C. subhirtella Pendula</i>	94	6	0	0	3	95	2	0	0	12	88	0	0	0	13	87
Норд Стар × (<i>C. lannesiana</i> № 2 × Франц Иосиф)	93	7	0	0	39	61	0	0	0	36	64	0	0	3	61	36
Норд Стар × 3-12 (сейнец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка)	91	9	0	0	40	58	2	0	0	48	52	0	0	0	55	45
Норд Стар × 3-16 (сейнец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка)	96	4	0	0	4	95	1	0	0	15	84	1	0	0	21	79
Молодежная × (<i>C. lannesiana</i> № 2 × Франц Иосиф)	83	17	0	0	5	94	1	0	1	38	61	0	0	2	18	80
Любская × (<i>C. lannesiana</i> № 2 × Франц Иосиф)	99	1	0	0	27	73	0	0	0	67	33	0	0	1	30	69

П р и м е ч а н и е. Всего просмотрено 322 зародыши. Ш, С, Т, Д — соответственно стадия шаровидная, сердечка, торпеды, дифференциации.

Наряду с нормальным эмбриогенезом в этих комбинациях иногда обнаруживались отклонения, впоследствии приводящие к формированию нежизнеспособных зародышей, — образование некрозов, начинающихся с отмирания отдельных клеток зародыша. У некоторых зародышей некрозы распространялись на довольно большие участки, что приводило к их гибели. Очевидно, гибель была обусловлена нарушениями гомеостаза внутри самого зародыша, а также между ним, развивающимся эндоспермом и окружающими его тканями. Несовместимость в этом случае носила постгам-

ный характер.

В комбинациях скрещиваний Норд Стар × *C. lannesiana* № 2, Норд Стар × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), Норд Стар × 3-112 (соянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Любская × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф) развитие зародышей было более замедленным. На 18-25-е сут после опыления они достигали шаровидной или сердцевидной стадии, на 26-29-е сут — стадий сердечка и торпеды. Наблюдались существенные нарушения в эмбриогенезе, связанные с процессом дифференцировки (отсутствие точки роста, недоразвитость семядолей и корешка, их неравномерное развитие). Они были обусловлены генетическими и физиологическими причинами. В этих случаях генетический контроль межвидовой несовместимости, видимо, осуществлялся не только многочисленными аллелями *S*-типа, влияющими на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок в столбике пестика, но и блоками полигенов, вызывающими нарушения в развитии эндосперма и зародыша. Плоды завязывались, однако происходила массовая гибель зародышей.

В большинстве комбинаций скрещивания нормальное развитие зародышей отмечали на ранних стадиях формирования семян, тогда как нарушения были приурочены к периоду морфологической дифференциации на органы. Массовые нарушения, приводившие к формированию нежизнеспособных зародышей, начинали появляться спустя 20-25 сут после опыления (на стадии ранней торпеды). Несколько раньше (18-25 сут, стадия сердечка) обнаруживались единичные отклонения в развитии зародышей.

Таким образом, среди представителей рода *Cerasus* Mill. наиболее совместимые комбинации скрещиваний сортов и форм на програмной стадии оплодотворения — Норд Стар × *C. subhirtella* Pendula, Норд Стар × 3-116 (соянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф). Нарушения в развитии зародышей наблюдаются в основном после завершения сердцевидной стадии развития. Следовательно, при селекции для доращивания гибридов в культуре *in vitro* целесообразно использовать в качестве экспланта зародыши на стадии сердечка спустя 18-25 сут после опыления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стороженко Е.М. Болезни плодовых культур и винограда. Краснодар, 1970.
2. Чеботарева М.С. Оценка устойчивости черешни и вишни к коккомикозу. Науч.-техн. бюл. ВИР (Л.), 1985, 162: 27-29.
3. Вышинская М.И. Итоги селекции вишни и черешни в республике Беларусь. В сб.: Плодоводство на рубеже XXI века. Минск, 2000: 58-59.
4. Колесникова А.Ф., Джиагадло Е.Н., Федотова И.Э. Создание экологически чистых адаптивных сортов и подвоев вишни для Центрального и Центрально-Черноземного регионов России. В сб.: Плодоводство на рубеже XXI века. Минск, 2000: 59-61.
5. Сомольякова В.М. Болезни плодовых пород юга России. Краснодар, 2000.
6. Ленивцева М.С., Кузнецова А.П., Волчков Ю.А. Внутривидовая дифференциация и структура популяций коккомикоза. Мат. Междунар. конф. «Информационные системы диагностики, мониторинга и прогноза важнейших сорных растений, вредителей и болезней сельскохозяйственных культур». Шведский университет аграрных наук, ВНИИ защиты растений РАСХН, Санкт-Петербургский аграрный университет, 2008: 54-55.
7. Чеботарева М.С. Состав генофонда родов *Cerasus* Mill., *Padus* Mill. и *Microcerasus* Webb emend. Spach по устойчивости к коккомикозу в связи с задачами селекции. Авто-реф. канд. дис. Л., 1986.
8. Волчков Ю.А., Кузнецова А.П. Изучение коллекции сортов на устойчивость к коккомикозу и монилиозу. В сб.: Сохранение и использование генофонда в селекции овощных и плодово-ягодных культур на юге России. Крымск, 2000: 129-130.
9. Ленивцева М.С., Кузнецова А.П., Щеглов С.Н. Стратегические основы

- селекции косточковых культур на устойчивость к коккомикозу. Наука Кубани, 2008, 3: 35-40.
10. Кузнецова А.П. Специализация и внутривидовая дифференциация возбудителя коккомикоза. В сб.: Оптимизация фитосанитарного состояния садов в условиях погодных стрессоров. Краснодар, 2005: 82-88.
 11. Кузнецова А.П., Алексина Е.М. Поиск доноров устойчивости к коккомикозу и монилиозу для использования в селекции черешни. В сб.: Современные проблемы научного обеспечения отраслей. Садоводство и виноградарство на пороге 21-го века. Краснодар, 1999: 75-77.
 12. Кузнецова А.П., Воронов А.А. Создание новых иммунных к коккомикозу декоративных форм в роде *Cerasus* Mill. В сб.: Декоративное садоводство России: состояние, проблемы, перспективы. Сочи, 2008: 151-156.
 13. Пашева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1980.
 14. Подубная - Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М., 1976.

*ГНУ Северо-Кавказский зональный НИИ
садоводства и виноградарства Россельхозакадемии,
350901 г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39,
e-mail: anpalkuz@mail.ru*

*Поступила в редакцию
9 февраля 2009 года*

CYTOEMBRYOLOGICAL ASPECTS OF INCOMPATIBILITY AMONG *Cerasus* Mill. UNDER DISTANT HYBRIDIZATION DURING BREEDING FORMS RESISTANT TO *Blumeriella* LEAF SPOT

A.P. Kuznetsova, G.K. Kiseleva

S u m m a r y

The harmful fungal disease caused by *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx (syn. *Cocomyces hiemalis* Higgins) results in an early exfoliation, an attenuation of trees, a reduction of productivity, an abatement of resistance to cold. The most virulent population of disease agent was revealed in Krasnodar region. In Northern Caucasian Zonal Scientific Research Institute of Orchard Culture and Viticulture the authors crossed a slightly infected varieties of cherries and crab cherries with immune samples of Eastern-Asiatic species — *Cerasus lannesiana* № 2, *C. serrulata* Hally Tolivetta, *C. subhirtella* Pendula. They carried out also a comparative cytoembryological analysis of different crossing combinations. The authors investigated the pollen fertility, the growth of pollen tubes in pistil tissues and embryogenesis. The most compatible combinations of crossing at the progamic stage of fertilization were Nord Star × *C. subhirtella* Pendula, Nord Star × 3-116 (seedling from free pollination *C. serrulata* Hally Tolivetta × Polyanka), Molodezhnaya × (*C. lannesiana* № 2 × Frants Iosif). The abnormalities in development of hybrid embryos were appeared after 18-25 days from pollination on a stage of the heart. This period is recommended for isolation of embryos with subsequent growing in vitro in order to overcome the postgamic incompatibility.

**Вниманию читателей! Вышла в свет книга:
Дьяков Ю.Т. Фундаментальная фитопатология.** М.: изд-во «Эдиториал УРСС», 2012, 512 с.

Настоящее пособие посвящено изложению наиболее важных проблем современной фитопатологии, прежде всего — молекулярных аспектов взаимоотношений растений и их паразитов. Молекулярные исследования механизмов фитоиммунитета позволили найти общие каналы эволюции иммунитета у растений, беспозвоночных и позвоночных животных и аргументировать наличие общей теории иммунитета. Молекулярные исследования показали также, что в основе рецепторных механизмов и сигнальной трансдукции растений, приводящих к паразитизму или симбиозу, нет принципиальных различий. Наконец, молекулярные исследования взаимодействий паразитов и растений привели к созданию нового поколения химических средств защиты растений — экологически безопасных, неспецифических и перистентных.

Все эти темы находятся в центре внимания книги. Кроме того, отдельные главы посвящены современным методам диагностики болезней растений, которые также широко используются при диагностике болезней животных и человека; общности реакции сверхчувствительности растений и апоптоза животных; экологическим аспектам болезней растений (новейшие данные свидетельствуют, что без паразитов не может стабильно существовать ни один биоценоз) и другим вопросам.

Книга предназначена для преподавателей, аспирантов и студентов классических университетов и сельскохозяйственных вузов, а также для научных сотрудников, работающих в области фитопатологии, защиты растений и сельскохозяйственной биотехнологии.