

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 фертильность пыльцы, изучали рост пыльцевых трубок в тканях пестика, следили за развитием зародышей. Наиболее совместимыми комбинациями скрещивания в прогамной стадии оплодотворения оказались Норд Стар × *C. subhirtella* Pendula, Норд Стар × 3-116 (сеянец 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 дозревания *in vitro* с целью преодоления постгамной несовместимости.

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

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) Agx (syn. *Coccomyces hiemalis* 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 эколого-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 — эффективный способ получения устойчивых форм.

В Северо-Кавказском зональном научно-исследовательском инсти-

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

туте 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 неполноценным 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 (сеянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Норд Стар × 3-116 (сеянец 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 Севе-ро-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</i> Pendula | 40,1 | 72,3 |
| <i>C. lannesiana</i> № 2 × Франц Иосиф | 49,5 | 63,0 |
| 3-112 (сеянец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка) | 23,6 | 85,0 |
| 3-116 (сеянец от свободного опыления <i>C. serrulata</i> Hally Tolivetta × Полянка) | 36,7 | 62,1 |
| Франц Иосиф | 34,3 | 81,3 |

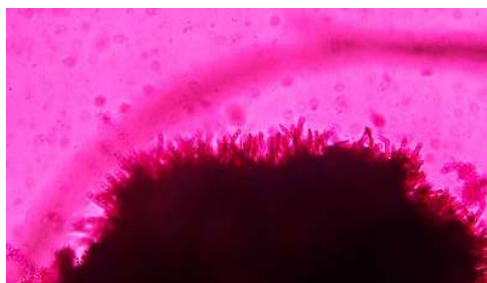
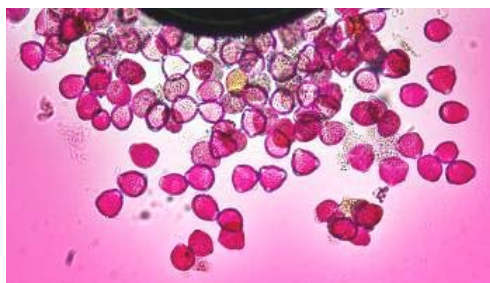


Рис. 1. Фертильность пыльцевых зерен у гибрида *Cerasus lannesiana* № 2 × сорт Франц Иосиф, выявленная при окрашивании ацетокармином (неокрашенные зерна стерильны). Увеличение ×100 (опытный участок Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства, Краснодарский край, 2008 год).

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 трубки росли сначала по папиллам рыльца, затем — по межклеточным пространствам в верхней части столбика и в канале стилодия по поверхности выступающих его клеток секреторной природы. Прогамная 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 (сеянец от свободного опыления *C. serrulata* Hally Tolivetta × Полянка), Молодежная × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф) пыльцевые зерна хорошо прорастали на рыльцах. Пыльцевые трубки широким пучком внедрялись в канал стилодия и достигали завязи. В комбинациях Норд Стар × 3-116 (сеянец 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 трубки достигали завязи примерно на 2 сут позже, чем в предыдущих комбинациях скрещиваний.

В комбинациях (Студенческая × *C. lannesiana* № 2) × Франц Ио-

сиф 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 прогамной 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 прогамную 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 (сеянец 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</i> Pendula | 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 (сеянец 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 (сеянец 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 |

Примечание. Всего просмотрено 322 зародыша. 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 постгамный характер.

В комбинациях скрещиваний Норд Стар × *C. lannesiana* № 2, Норд Стар × (*C. lannesiana* № 2 × Франц Иосиф), Норд Стар × 3-112 (сеянец 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 прогамной стадии оплодотворения — Норд Стар × *C. subhirtella* Pendula, Норд Стар × 3-116 (сеянец 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.

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

Поступила в редакцию
9 февраля 2009 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2013, № 5, pp. 69-74

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

A.P. Kuznetsova, G.K. Kiseleva

North-Caucasian Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russian Academy of Agricultural Sciences,
39, ul. 40 Let Pobedy, Krasnodar, 350901 Russia, e-mail anpalkuz@mail.ru

Received February 9, 2009

doi: 10.15389/agrobiology.2013.5.69eng

Acknowledgements:

Supported by Russian Foundation for Basic Research and Administration of Krasnodarskii Krai

Abstract

The harmful fungal disease caused by *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx (syn. *Coccomyces 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.

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

REFERENCES

1. Storozhenko E.M. *Bolezni plodovykh kul'tur i vinograda* [Diseases of Horticultural Crops and Grape]. Krasnodar, 1970.
2. Chebotareva M.S. *Nauchno-tehnicheskii byulleten' VIR (Leningrad)*, 1985, 162: 27-29.
3. Vyshinskaya M.I. *Plodovodstvo na rubezhe XXI veka* [Horticulture at the Beginning of 21st Century]. Minsk, 2000: 58-59.
4. Kolesnikova A.F., Dzhigadlo E.N., Fedotova I.E. *Plodovodstvo na rubezhe XXI veka* [Horticulture at the Beginning of 21st Century]. Minsk, 2000: 59-61.
5. Smol'yakova V.M. *Bolezni plodovykh porod yuga Rossii* [Diseases of Horticultural Species in Southern Russia]. Krasnodar, 2000.
6. Lenitseva M.S., Kuznetsova A.P., Volchkov Yu.A. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii «Informatsionnye sistemy diagnostiki, monitoringa i prognoza vazhneishikh sornykh rastenii, vrediteli i boleznei sel'skokhozyaistvennykh kul'tur»* [Information Systems for Diagnostics, Monitoring and Forecasting the Main Weeds, Pests and Diseases of Crops (Proc. Int. Conf.)]. Shvedskii universitet agrarnykh nauk, VNII zashchity rastenii RASKHN, St. Petersburgskii agrarnyi universitet, 2008: 54-55.
7. Chebotareva M.S. *Sostav genofonda rodov Cerasus Mill., Padus Mill. i Microcerasus Webb emend. Spach po ustoichivosti k kokkomikozu v svyazi s zadachami selektsii* [Coccomycosis Resistance Gene Pools in *Cerasus* Mill., *Padus* Mill. and *Microcerasus* Webb emend. Spach as Related to Breeding]. Leningrad, 1986.
8. Volchkov Yu.A., Kuznetsova A.P. *Sokhranenie i ispol'zovanie genofonda v selektsii ovoshchnykh i plodovo-yagodnykh kul'tur na yuge Rossii* [Gene Pool Conservation and Use for Breeding in Horticulture in Southern Russia]. Krymsk, 2000: 129-130.
9. Lenitseva M.S., Kuznetsova A.P., Shcheglov S.N. *Nauka Kubani*, 2008, 3: 35-40.
10. Kuznetsova A.P. *Optimizatsiya fitosanitarnogo sostoyaniya sadov v usloviyakh pogodnykh stressorov* [Optimization of Orchards' Phytosanitary Status under Climatic Stresses]. Krasnodar, 2005: 82-88.
11. Kuznetsova A.P., Alekhina E.M. *Sovremennye problemy nauchnogo obespecheniya otraslei. Sadovodstvo i vinogradarstvo na poroge 21 veka* [Modern Problems of Scientific Support in Agrobusiness Industries. Horticulture and Viticulture at the Beginning of 21st Century]. Krasnodar, 1999: 75-77.
12. Kuznetsova A.P., Voronov A.A. In: *Dekorativnoe sadovodstvo Rossii: sostoyanie, problemy, perspektivy* [Landscape Gardening in Russia: State, Problems, and Prospects]. Sochi, 2008: 151-156.
13. Pausheva Z.P. *Praktikum po tsitologii rastenii* [Plant Cytology (Practical Course)]. Moscow, 1980.
14. Poddubnaya-Arnol'di V.A. *Tsitoembriologiya pokrytosemennykh rastenii* [Cytoembryology of Angiosperm Plants]. Moscow, 1976.