

## РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОЗОВОЦВЕТКОВОГО ДЕКОРАТИВНОГО ГИБРИДА *FRAGARIA* × *POTENTILLA* (СОРТ FREL) В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ

С.О. Батури́н, Л.Л. Кузнецова

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: SO\_baturin@mail.ru

Изучены репродуктивные особенности розовоцветкового декоративного сорта Frel (гибрид *Fragaria* × *Potentilla*). Жизнеспособность пыльцы до 90 %, доля полноценных семян на ягоду при самоопылении составляет  $33,9 \pm 1,8$  %, а всхожесть семян варьирует от 12,5 до 71,3 %. Сорт является миксоплоидом, формирующим преимущественно гаметы с  $n = 28$ . Результаты генетического анализа указывают на доминантный монофакториальный контроль розовой окраски венчика с полисомической хроматидной сегрегацией аллелей. Сорт Frel по признаку «розовая окраска венчика» является гетерозиготным: при самоопылении образуется 41,2 % белоцветковых семян – рецессивных гомозигот, а при гибридизации с *F.* × *ananassa* до 63,1 %. Гибриды *F.* × *ananassa* × Frel имеют низкую семенную фертильность, для получения урожайных розовоцветковых гибридов с выполненными ягодами необходим длительный отбор фертильных семян в ряду поколений.

**Ключевые слова:** розовоцветковая земляника, *Fragaria* × *ananassa*, *Fragaria* × *Potentilla*, фертильность пыльцы, семенификация, проточная цитометрия, селекция, миксоплоидия, ремонтантность.

### Введение

Коммерческие сорта крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.,  $2n = 8x = 56$ ) имеют венчик белой окраски. Розовая окраска венчика отмечена лишь у отдельных форм *F. vesca* (East, 1930). В начале 1960-х гг. в Англии были осуществлены успешные скрещивания по интрогрессии розовой окраски венчика в генофонд *F.* × *ananassa* (Ellis, 1962). Первый запатентованный сорт розовоцветковой земляники носит название Frel (коммерческое название Pink Panda) (Ellis, 1991). Он был получен в результате межродовой гибридизации *F.* × *ananassa* и *Potentilla palustre* (*Comarum palustris*) ( $2n = 6x = 42$ ) с последующим колхицинированием проростков и беккроссированием полученных семян (Ellis, 1962). В скрещиваниях в качестве опылителя использовался *C. palustre*, который имел пурпурную окраску венчика. По мнению автора патента, сорт Frel представляет собой линию крупноплодной земляники с

добавленными хромосомами и является земляникой на 96 %. Frel упоминается в родословных нескольких сортов и гибридов розовоцветковой земляники (Батури́н, Кузнецова, 2010).

В настоящее время сортимент земляники с розовыми цветками насчитывает не более 30 сортов и гибридов преимущественно декоративного назначения (Khanizaden, 2000), которые зачастую не способны давать удовлетворительный урожай плодов с приемлемыми вкусовыми качествами (Mabberley, 2002; Батури́н, Кузнецова, 2010). В селекции розовоцветковых земляник наиболее важной является задача повышения продуктивности и улучшения качества плодов. Несмотря на низкую урожайность и посредственный вкус ягод, существующие розовоцветковые сорта пользуются большим спросом у садоводов-любителей благодаря их декоративности, а кроме того, находят все более широкое применение в ландшафтном дизайне (Bentvelsen *et al.*, 2006).

Цель данного исследования – изучить возможности использования сорта Frel при созда-

нии отборных форм розовоцветковой земляники, пригодных для выращивания в открытом грунте в условиях Западной Сибири.

### Материал и методы

#### Исходный материал

В исследование были вовлечены сорт Frel, относящийся к розовоцветковым декоративным земляникам с ремонтантным типом цветения, а также белоцветковые образцы (8х) *Fragaria* × *ananassa* из экспериментального фонда земляник лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН. Растения сорта Frel морфологически схожи с представителями *Fragaria* × *ananassa*, вегетативно размножаются при помощи укореняющихся розеток наземных столонов. Цветки Frel – совершенные (обоеполые), что обуславливает их самоплодность. Главной особенностью этого сорта является уникальная для представителей *Fragaria* розовая окраска лепестков. Следует отметить, что в условиях Западной Сибири сорт Frel обладает хорошей зимостойкостью, а также некоторой устойчивостью к болезням и вредителям.

#### Анализ фертильности пыльцы

Определение фертильности пыльцы проводили окрашиванием в течение 24 часов при температуре 20–22 °С солянокислым спиртовым кармином (Snow, 1965) пыльцевых зерен (не менее 1500 шт.), извлеченных из предварительно фиксированных в растворе Карнуа (Барыкина и др., 2004) полураскрытых бутонов.

#### Определение числа хромосом и плоидности растений

Подсчет числа хромосом в соматических тканях сорта Frel проводили при помощи микроскопа Zeiss AxioStar Plus на временных препаратах меристематической зоны корешков, окрашенных лактопропионовым орсеином (Preeda *et al.*, 2007).

Для определения плоидности сеянцев, полученных от самоопыления сорта Frel, использовали проточный цитометр CyFlow Green Partec, Münster, Germany. Анализ проведен в

Университете технологии и естественных наук, г. Быдгощ, Польша. Для каждого образца было проанализировано от 7000 до 10000 ядер, извлеченных из растительных тканей листьев. Приготовление суспензии ядер готовили по методике J. Dolezel с соавт. (1998), содержание ядерной ДНК определялось согласно методике D.W. Galbraith с соавт. (1998). Анализ гистограмм проводился с использованием компьютерной программы DPAC v.2.2.

#### Техника скрещиваний

При самоопылении и направленных скрещиваниях соцветия изолировали прозрачным упаковочным целлофаном. Кастрацию обоеполых цветков проводили удалением андроеца вместе с околоцветником. Соцветия помещали в изолятор, вокруг основания цветоноса прокладывалась вата для предотвращения попадания насекомых (возможных переносчиков пыльцы), сверху изолятор у основания завязывали тонким шпагатом с этикеткой. Для скрещиваний использовали свежую пыльцу, выделенную из раскрывающихся (но еще с сомкнутыми лепестками) бутонов, подсушенную при температуре 20–22 °С без прямого доступа солнечных лучей. Опыление проводили через 2–3 дня после кастрации. Пыльцу наносили мягкой кисточкой однократно. Для проведения опытов по самоопылению изолировали цветоносы с нераскрывшимися бутонами.

#### Анализ семенификации плодов

Осемененность (семенификация, %) определяли как отношение нормально выполненных семян к общему числу завязей в процентах. Для этого верхний слой каждой ягоды (40 шт.) плотно прижимали к картону, просушивали при комнатной температуре, а затем проводили подсчет семянок с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9.

#### Выращивание сеянцев

Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге после 3-месячной стратификации при температуре 4 °С, после чего их высаживали в пикировочные ящики. В

возрасте 3–4 месяцев сеянцы высаживались в открытый грунт, где их доращивали в условиях стандартного агрофона. Специальное укрытие в зимний период не применяли.

### Результаты

Предварительные данные о жизнеспособности пыльцы дает анализ доли окрашенных пыльцевых зерен. Жизнеспособность пыльцы у сорта Frel составила  $90,4 \pm 0,56\%$ , что свидетельствует о ее хорошем качестве, учитывая межродовое происхождение сорта. Следует отметить, что на препаратах окрашенной пыльцы, выделенной из некоторых цветков, с частотой 1,2% встречались пыльцевые зерна очень крупных размеров, которые, по-видимому, являются производными монад (рис. 1).

При самоопылении сорт Frel формирует мелкие безвкусные ягоды, как правило, при осеннем плодоношении. Ягоды развиваются на небольшом числе цветков, плодовитость варьирует от 21 до 34%. Доля полноценных семянок на ягоду составила  $33,9 \pm 1,8\%$ , что является достаточным условием для развития ягод, хотя и не вполне морфологически выполненных.

За период 1996–2010 гг. было выделено и проанализировано на всхожесть 1673 семянки, развившиеся в условиях инбридинга. Всхожесть

семян в различные годы колебалась в пределах от 12,5 до 71,3%. Проростки часто погибали на ювенильной стадии и до цветения доживала незначительная часть сеянцев, как правило, около 3,5% (изредка до 40,0%) от числа взшедших семян. Биоморфологический анализ сеянцев выявил фенотипы, значительно отличающиеся от фенотипа исходного сорта Frel. Различия среди потомков наблюдались по таким признакам, как высота растений, площадь и степень насыщенности зеленой окраски листа, способность развивать наземные столоны и др. Кроме того, при анализе семенного потомства  $I_1$  сорта Frel выявлена сегрегация по тональности розовой окраски венчика, вплоть до выщепления белоцветковых растений (41,2%) (табл. 1). Появление растений с белой окраской венчика – рецессивных гомозигот – свидетельствует о гетерозиготности сорта. Результаты анализирующего скрещивания также указывают на гетерозиготность сорта Frel. В результате использования его в качестве опылителя в скрещиваниях с перспективными октоплоидными белоцветковыми гибридами  $F \times ananassa$  в потомстве  $F_1$  белоцветковые сеянцы регистрируются в среднем с частотой 63% (табл. 2).

Потомство от самоопыления белоцветковых гибридов  $F_1$ , а также от их скрещивания между собой было представлено только белоцветковыми сеянцами (табл. 2). Из чего следует, что проанализированные гибриды были гомозиготными по белой окраске венчика. Напротив, гибриды  $F_1$  с розовыми цветками при самоопылении и анализирующем скрещивании дали потомство с белыми цветками (60,1% при самоопылении) и розовыми цветками, которое можно ранжировать по тональности розовой окраски цветков. Один из розовоцветковых гибридов  $F_2$  – № 00/9-30-5 с пестичным типом цветков при открытом опылении (рядом произрастали преимущественно белоцветковые формы крупноплодной земляники) успешно формировал семенное потомство, в котором доля белоцветковых растений составила 65,4%. У этого гибрида характер сегрегации по окраске венчика в семенном потомстве при открытом опылении оказался близок к сегрегации при анализирующем скрещивании – 63,1% (табл. 2), что указывает на перенос пыльцы насекомыми с белоцветковых форм при открытом опылении. У крупноплод-

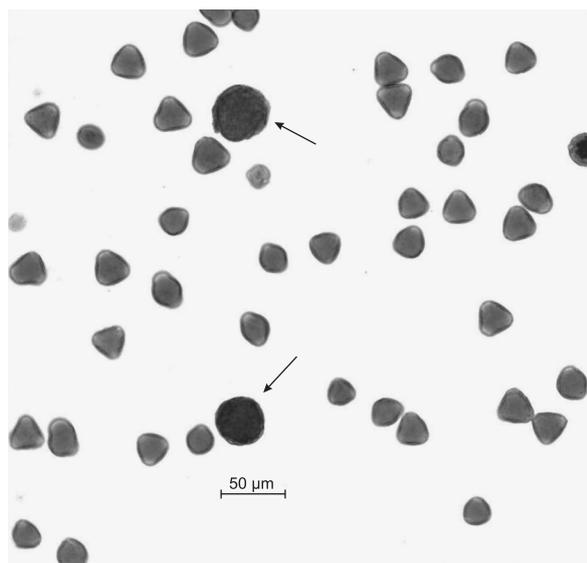


Рис. 1. Пыльцевые зерна сорта Frel (стрелками указаны необычно крупные пыльцевые зерна, по-видимому, производные монад).

Таблица 1

## Сегрегация по окраске венчика в семенных потомствах

Образец/ комбинация скрещивания	Белый с розовыми жилками	Светло-розовый	Розовый	Темно-розовый	Белый
Самоопыление					
Frel*	0	3	6	1	7 (41,2 %)
97/2-1-6*	0	8	6	2	25 (60,1 %)
97/2-1-4	0	0	0	0	11 (100 %)
Сибкроссы					
97/3-75-6* × 97/2-1-4	0	0	5	0	2 (28,6 %)
97/3-76-6 × 97/2-1-4	0	0	0	0	142 (100 %)
Открытое опыление					
00/9-30-5*	3	12	11	1	51 (65,4 %)

Примечание. \* Цветки с розовой окраской венчика.

Таблица 2

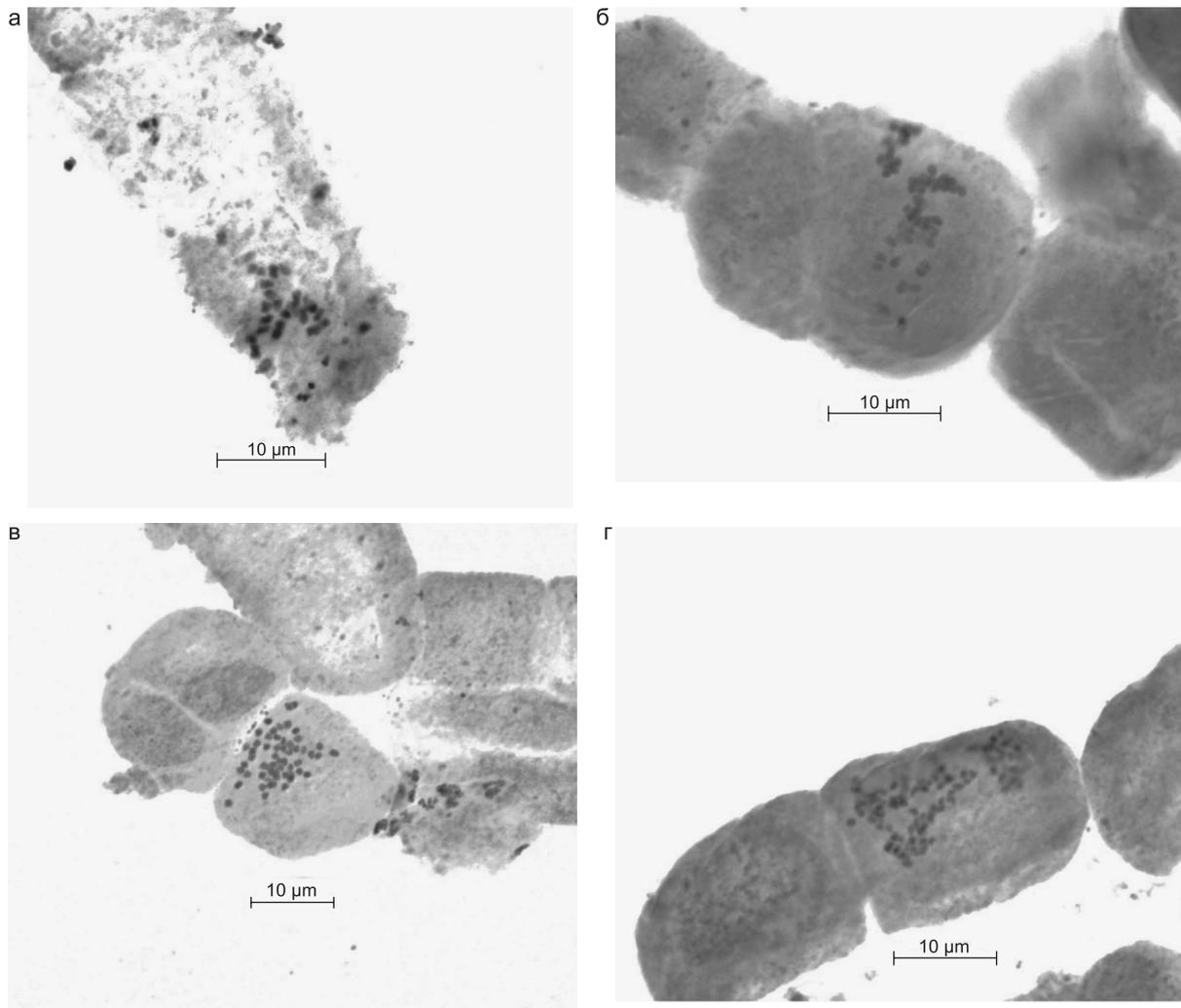
Сегрегация по окраске венчика в потомствах F<sub>1</sub>, полученных с участием сорта Frel

Материнская форма <i>F. × ananassa</i>	Окраска венчика семянцев				
	слегка розовый	светло-розовый	розовый	темно-розовый	белый
58д	5	7	17	3	52 (61,9 %)
Д-3-3-1	0	0	3	0	9 (75,0 %)
Л-1-15-1	0	2	5	0	15 (68,2 %)
сорт Elin	1	4	1	0	6 (60,0 %)
Всего	6	13	26	3	82 (63,1 %)

ной земляники число развившихся семянков и равномерность их расположения на ягоде обуславливают полноценную форму ягоды. Развитие семянков на ягоде менее 50% часто становится причиной появления ягод неполноценной формы. Осемененность ягод розовоцветкового гибрида № 00/9-30-5 составила  $43,8 \pm 3,4\%$ , что недостаточно для формирования выполненных ягод. Однако в его семенном потомстве удалось выделить розовоцветковые сеянцы № 05/2-35-1 и № 05/2-14-6, у которых семенификация составляет  $72,0 \pm 4,6\%$  и  $80,2 \pm 2,4\%$  соответственно, что обуславливает развитие более выполненных ягод.

Высокая стерильность гибридов F<sub>1</sub> (*F. × ananassa* × Frel) инициировала нас на подсчет числа хромосом в соматических тканях у сорта Frel, поскольку опубликованных сведений по числу хромосом у этого сорта мы не обнаружили. Изу-

чение 20 метафазных пластинок в клетках зоны роста корешков сорта Frel показало наличие разного числа хромосом: от  $2n = 28$  до  $2n = 70$ . Были обнаружены клетки со следующим числом хромосом:  $2n = 28, 35, 40, 42, 45, 49, 50, 56, 61, 63, 70$  (рис. 2). Таким образом, в тканях сорта Frel наблюдалась явно выраженная миксоплоидия. Следовательно, потомство сорта Frel от самоопыления и гибридизации с *F. × ananassa* может иметь разное число хромосом, что объяснило бы стерильность некоторых из них. Мы оценили общее содержание ДНК и его соответствие уровню пloidности у трех случайным образом отобранных сеянцев, полученных от самоопыления сорта Frel с помощью проточной цитометрии. На рис. 3 приводится сравнение двух цитометрических гистограмм: одна принадлежит известному октоплоидному сорту Mieke Schindler, другая –



**Рис. 2.** Метафаза в соматических клетках корня сорта Frel.

а –  $2n = 28$ ; б –  $2n = 42$ ; в –  $2n = 56$ ; г –  $2n = 70$ .

растениям инбредного потомства сорта Frel. С учетом значения внутреннего стандарта (редька посевная, сорт *Saxa*) было определено содержание ДНК, выраженное в пикограммах (пг) на клетку. Содержание ДНК у растений сорта *Mieze Shcindler* составило  $1,856 \pm 0,011$  пг, в то время как содержание ДНК у сеянцев сорта Frel –  $1,886 \pm 0,016$  пг, что указывает на преобладание октоплоидной группы клеток в исследуемых образцах сеянцев, т. е.  $2n = 8x = 56$ . Следовательно, три проанализированных сеянца сорта Frel являлись октоплоидами.

Из потомства  $F_1$  (*F. × ananassa × Frel*) подсчет числа хромосом провели при помощи световой микроскопии на корешках наиболее фертильного гибрида № 96/5-57-1 (*58д × Frel*). Анализ метафазных пластинок показал  $2n = 56$ , что

отчасти объясняет его семенную фертильность, достаточную для формирования относительно выполненных ягод.

### Обсуждение

Семенное воспроизводство межродовых гибридов всегда сопряжено с трудностями из-за низкого качества мужского и женского гаметофитов, которое, как правило, обусловлено отсутствием гомологичности хромосом. Использование розовоцветкового межродового гибрида (*Fragaria × Potentilla*) сорта Frel в гибридизации стало возможным благодаря хорошей фертильности пыльцы. Природа такой высокой фертильности пыльцы пока остается неясной, поскольку при наличии миксоплоидии,

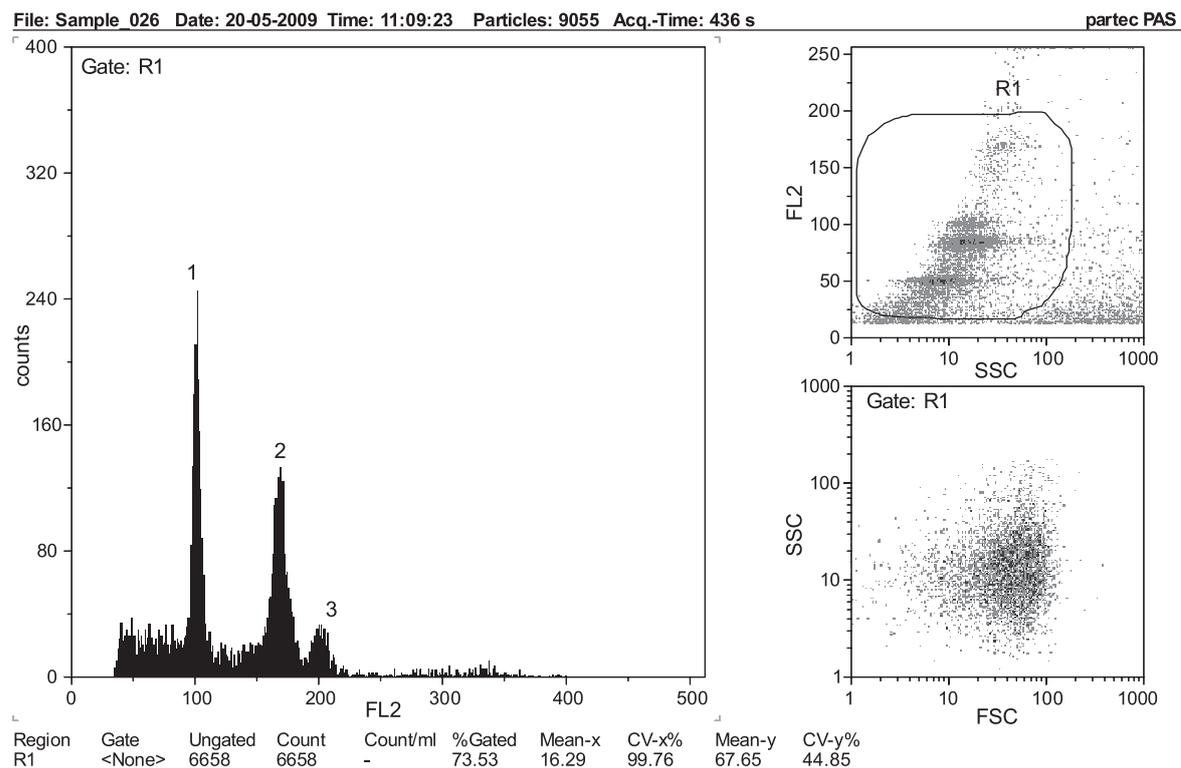
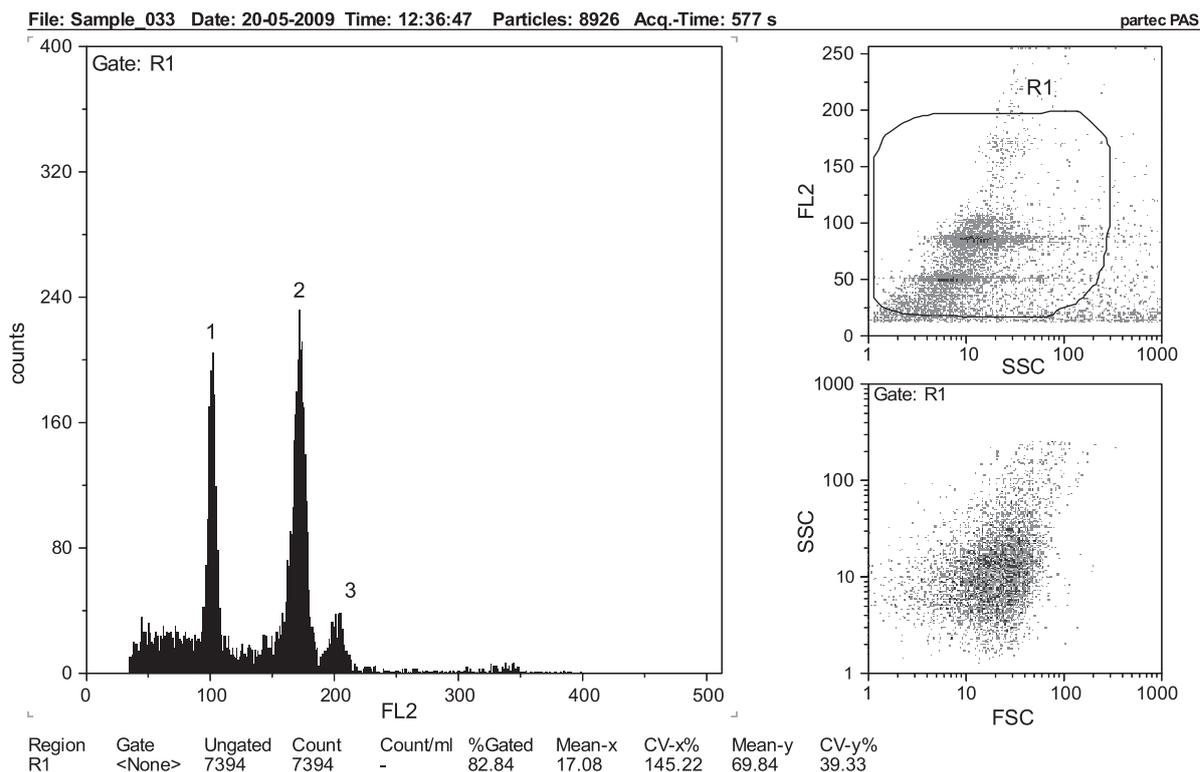


Рис. 3. Цитометрический анализ семян от самоопыления сорта Frel.

а – ДНК-гистограмма растений октоплоидного сорта Mizee Shcindler (пик 2), пик 1 соответствует внутреннему стандарту – *Raphanus sativus*, сорт Саха (2С ДНК содержание – 1, 11 пг); пик 3 – ядрам *Raphanus sativus*, находящимся в G<sub>2</sub> стадии интерфазы; б – ДНК-гистограмма семян, полученных от самоопыления сорта Frel (пик 2). Пик 1 соответствует внутреннему стандарту – *Raphanus sativus*, сорт Саха, (2С ДНК содержание – 1, 11 пг); пик 3 – ядрам *Raphanus sativus*, находящимся в G<sub>2</sub> стадии интерфазы.

обнаруженной нами в соматических тканях растений этого сорта, следует ожидать обратный эффект – низкую фертильность пыльцы из-за нарушений расхождения хромосом в микроспорогенезе. Известно, что у многих межродовых гибридов культурных растений миксоплоидия в археспориальной ткани является одной из причин возникновения анеуплоидных гамет (Кунах, 1995). В нашем случае можно предположить, что на зародышевом пути «успешными», т. е. формирующими жизнеспособные гаметы, будут те мега- и микроспороциты, которые будут содержать сбалансированное число хромосом и, по-видимому, таковыми оказываются чаще всего спороциты с  $2n = 56$ . Это объясняет наличие октоплоидных семян при самоопылении сорта Frel и октоплоидного розовоцветкового гибрида F<sub>1</sub> № 96/5-57-1. Однако причина появления стерильных и полустерильных семян в I<sub>1</sub> и гибридов в F<sub>1</sub> остается до конца неясной. С одной стороны, возможно влияние миксоплоидии в археспориальной ткани, когда в мейоз могут вступать не только октоплоидные спороциты (как у *F. × ananassa*), но и спороциты с другим уровнем ploидности, в том числе и анеуплоидные; с другой стороны, анеуплоидные гаметы могут быть результатом отсутствия (полной или частичной) бивалентной конъюгации хромосом в спорогенезе из-за межродового (*Fragaria × Potentilla*) происхождения сорта Frel. Тем не менее очевидно, что чем более будут сбалансированы геномы *Fragaria* и *Potentilla* по бивалентной конъюгации хромосом у гибридов, тем выше фертильность пыльцы. Для того чтобы достичь высокой фертильности мужских и женских гамет, необходим длительный отбор в гибридных потомствах наиболее фертильных семян. Нами начаты такие отборы, результатом которых являются гибриды № 05/2-35-1 и № 05/2-14-6, которые имеют хорошую завязываемость семян (до 80%), что обуславливает выполненность ягод.

Таким образом, сорт Frel является миксоплоидом, формирующим преимущественно гаметы с  $n = 28$ . Высокая жизнеспособность пыльцы – до 90% позволяет использовать сорт в качестве опылителя для создания розовоцветковых гибридов разного направления использования. Анализ гибридного поколения (F<sub>1</sub>), полученного от опыления пыльцой Frel образцов

*F. × ananassa*, показал сегрегацию по признаку «окраска лепестков венчика». При самоопылении образуется 41,2% белоцветковых семян – рецессивных гомозигот, а при гибридизации с *F. × ananassa* – до 63,1%. Среди потомств розовоцветковых гибридов наблюдается плавный переход в интенсивности окраски венчика от интенсивно-розового до бледно-розового, что исключает дисомический контроль признака. Результаты генетического анализа свидетельствуют о доминировании розовой окраски венчика с предположительно полисомической хроматидной сегрегацией аллелей в семенных потомствах. Ранее эта модель наследования была описана и для других репродуктивных признаков *Fragaria × ananassa*, таких, как тип пола цветков и характер плодоношения (Малецкий и др., 1994; Батурин и др., 1995). Насыщающие скрещивания отборных розовоцветковых гибридов с лучшими сортами крупноплодной земляники и гибридами – донорами аромата и вкуса плода – позволяют создавать исходный материал для выведения сортов крупноплодной земляники многоцелевого (пищевого и декоративного) использования.

### Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории молекулярной биологии и цитометрии факультета генетики и селекции растений Университета технологии и естественных наук, г. Быдгощ, Польша и лично профессора сельскохозяйственных наук доктора Эльвиру Сливинска за проведенный цитометрический анализ экспериментальных образцов земляники.

### Литература

- Батурин С.О., Кузнецова Л.Л. Состояние и перспективы селекции розовоцветковой крупноплодной земляники (*Fragaria × ananassa* Duch.) в Западной Сибири // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 165–171.
- Батурин С.О., Сухарева Н.Б., Малецкий С.И. Использование апомиксиса для изучения наследования ремонтантности у Земляники крупноплодной (*Fragaria × ananassa* Duch.) // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1418–1424.
- Малецкий С.И., Сухарева Н.Б., Батурин С.О. Наследование пола у апомиктических семян Земля-

- ники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 237–243.
- Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. 1995. Т. 11. № 6. С. 5–40.
- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
- Bentvelsen G.C.M., Bouw E. Breeding ornamental strawberries // Acta Hort. (ISHS). 2006. N 708. P. 455–457.
- Dolezel J., Greilhuber J., Lucretti S. *et al.* Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison // Ann. Bot. 1998. N 82. P. 17–26.
- East E.M. The production of homozygotes through induced parthenogenesis // Science. 1930. V. 72. N 1858. P. 148–149.
- Ellis J.R. *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria* // Proc. Linnean Soc. of London. 1962. N 173. P. 99–106.
- Ellis J.R. *Fragaria* Frel. 1991. United States Patent PP07598 // Patents online. available at <http://www.freepatentsonline.com/PP07598.html>
- Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants // Current Protocols in Cytometry / Eds J.P. Robinson, Z. Darzynkiewicz *et al.* 1998. 7.6.1–7.6.22.
- Khanizaden S. New hardy day-neutral red flowering strawberry cultivars // Acta Hort. 2000. V. 538. P. 779–780.
- Mabberley D.J. *Potentilla* and *Fragaria* (Rosaceae) reunited // Telopea. 2002. N 9(4). P. 793–801.
- Preeda N., Yanagi T., Sone K. *et al.* Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries // Scientia Hort. 2007. V. 114. N 2. P. 133–137.
- Snow R.S. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for squash preparations // Stain Techn. 1965. V. 38. P. 9–13.

## REPRODUCTION FEATURES OF THE PINK-FLOWERING ORNAMENTAL *FRAGARIA* × *POTENTILLA* (CV. FREL) HYBRID AND PROSPECTS OF ITS USE IN GARDEN STRAWBERRY BREEDING

S.O. Baturin, L.L. Kuznetsova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: [baturin@bionet.nsc.ru](mailto:baturin@bionet.nsc.ru)

### Summary

The ornamental pink-flowering cultivar Frel (*Fragaria* × *Potentilla*) is a mixoploid producing mainly gametes with  $n = 28$ . Frel pollen viability reaches 90%, seed set percentage averages  $33,9 \pm 1,8\%$ , and germination capacity varies from 12,5 to 71,3%. White-flowering recessive homozygous descendants constitute 41,2% of the progeny of selfing of the hybrid, demonstrating its heterozygous state. The frequency of white-flowering plants in *F* × *ananassa* crosses is 63,1%. The «corolla color» trait shows octosomic inheritance with the chromatid type of gene segregation. In order to obtain fruit-producing pink-flowering hybrids, long-term selection of fertile seedlings from the Frel × *F* × *ananassa* hybrid population is required.

**Key words:** pink-flowering strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, *Fragaria* × *Potentilla*, pollen fertility, seed set, flow cytometry, breeding, mixoploidy, everbearing.