

УДК 633.854.78:631.5:581.1

И. В. ТОЦКИЙ, асп.,
В. А. ЛЯХ, д. б. н., зав. каф.
Запорожский национальный университет
e-mail: lyakh@iname.com

МИКРОГАМЕТОФИТНЫЙ ОТБОР КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ У ПОДСОЛНЕЧНИКА

Изучали влияние пыльцы гибридов F_1 подсолнечника культурного после выдерживания ее при пониженной температуре на холодоустойчивость спорофитных популяций F_2 . Оценка велась по проценту прорастания семян в условиях пониженной температуры. Также исследовали влияние гаметофитного отбора на долю растений F_2 , несущих маркерный признак «дихотомическое жилкование». Выдерживание пыльцы гибридов F_1 при пониженной температуре увеличивало холодоустойчивость расщепляющихся популяций спорофитов F_2 . Кроме того, указанная обработка пыльцы насыщала популяции F_2 генотипами, несущими маркерный признак «дихотомическое жилкование».

Ключевые слова: подсолнечник культурный, пыльца, гаметофитный отбор, маркерный признак, холодоустойчивость, популяция F_2 .

Введение. Подсолнечник — культура южных регионов и её продвижение на север и дальнейшее увеличение посевных площадей сдерживается недостаточной холодостойкостью растений, особенно на ранних этапах. В северных зонах высевают его в наиболее ранние сроки для того, чтобы урожай успел созреть. Ранний посев подсолнечника желателен и в условиях юга — для максимального использования запасов почвенной влаги. Именно поэтому важно иметь холодоустойчивые генотипы, что является целью ряда селекционных программ. Растение подсолнечника теплолюбиво. Оптимальная температура для его роста и развития 25–27 °С, семена начинают прорастать при 5–10°, всходы выдерживают кратковременные заморозки до минус 5–6°. Минимальная сумма эффективных температур (> 6°) для раннеспелых сортов и гибридов, имеющих вегетационный период около 150 дней, составляет 1450 °С, т. е., начиная со второй половины мая, средняя температура должна составлять 15°. Особенно высоки требования к теплу в периоды бурного роста и цветения растения вплоть до созревания (июль — сентябрь). Оптимальная температура для фотосинтеза 25 °С. Похолодание в период образования цветков (в фазе 8–12 листьев) снижает их число [1].

Скороспелые и раннеспелые сорта и гибриды при продвижении на север часто существенно удлиняют вегетационный период либо резко снижают урожайность. Основными причинами этого являются чувствительность к фотопериоду и недостаточная холодостойкость растений [2].

Считают, что для подсолнечника важно увеличивать его устойчивость к холоду на начальных этапах роста и развития, т. е. при прорастании семян, на стадии всходов и 2–3 пары листьев для того, чтобы ранний посев был успешным. На больших высотах и в холодных регионах необходимо увеличивать морозостойкость при созревании для возможности выращивания в данных условиях. Источниками морозостойкости могут быть дикие виды *Helianthus*, растущие в горах, где суровые зимы и холодная весна. Однако селекционные работы относительно холодостойкости подсолнечника практически не ведутся [3].

Холодостойкость является полигенным признаком, и некоторые авторы уже выделили ряд генов, ответственных за раннюю реакцию растения на низкие температуры [4].

Селекция растений на холодостойкость может проводиться как на уровне спорофита, так и на уровне гаметофита. С помощью проращивания семян при пониженных температурах были выделены некоторые холодоустойчивые сорта [5]. Но в отношении пыльцевого отбора на холодоустойчивость у подсолнечника исследования не известны. Однако у других культур уже успешно проведён гаметофитный отбор на устойчивость к холоду. Так, у рапса выдерживание пыльцы гибридов F_1 при пониженных температурах [6], а также отбор на стадии роста пыльцевых трубок увеличили холодостойкость спорофитных популяций F_2 [7]. Также успешно проведен микрогаметофитный отбор на холодостойкость у льна [8], кукурузы [9] и огурцов [10]. Использование в селекционных программах методики пыльцевого отбора на холодоустойчивость на стадии роста пыльцевых трубок привело к созданию холодоустойчивых генотипов нута [11]. Ряд экспериментов по пыльцевой селекции проведен и на томате. Как выдерживание пыльцы при пониженной температуре [12], так и воздействие пониженной температуры на её формирование и рост пыльцевых трубок приводили к увеличению холодоустойчивости образующихся спорофитов [13]. У томата результативными были также эксперименты по макрогаметофитному отбору на холодоустойчивость [12]. Использовали и одновременный отбор по устойчивости к пониженной температуре на гаметофитном и спорофитном уровнях, который оказался более результативным, чем каждый из них в отдельности [14; 15]. С использованием техники пыльцевого отбора получены холодоустойчивые сорта репы японской и перца сладкого [16].

Целью работы было изучение влияния гаметофитного отбора, проводимого путём выдерживания пыльцы при пониженной температуре у гибридов F_1 на холодоустойчивость спорофитных популяций F_2 .

Материалы и методы. Материалом исследования были гибриды двух комбинаций скрещивания — «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» и «*xantha*» × «дихотомическое жилкование». Предварительные исследования показали, что линия «дихотомическое жилкование» была более холодостойкой, чем линия «*xantha*».

Линии «*xantha*» и «дихотомическое жилкование» получены путём экспериментального мутагенеза. Мутантный образец «дихотомическое жилкование» несёт маркерный признак измененного жилкования листа. В отличие от исходной линии, которая имеет сетчатое жилкование, мутант характеризуется более густой сетью веерообразно расположенных жилок. Мутантный признак хорошо идентифицируется на ранних стадиях развития растения [17].

Гибриды первого поколения получали с помощью принудительного переопыления. Материнские растения заранее кастрировали.

Для проведения гаметофитного отбора пыльцевую смесь нескольких соцветий гибридов F_1 в пергаментных пакетиках выдерживали в холодильнике при температуре 3 ± 1 °C в течение 7 суток у растений F_1 «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» и 8 суток у растений «*xantha*» × «дихотомическое жилкование». К концу хранения пыльца значительно теряла свою жизнеспособность. Затем хранившейся пылью опыляли ранее кастрированные гибридные растения той же комбинации скрещивания. В качестве контроля использовали растения, опыленные свежесобранной пылью.

Оценивали спорофитные популяции F_2 на холодостойкость проращиванием семян при пониженной температуре. Семена обрабатывали в течение 10 минут 1 %-м раствором $KMnO_4$ для предотвращения развития плесени. Затем раскладывали по 25 штук на фильтровальную бумагу в чашки Петри, предварительно прогретые для стерилизации при 150 °C в течение 1 часа. В каждую чашку Петри наливали по 10 мл предварительно прокипяченной в течение 5 минут дистиллированной воды, в которую были добавлены нистатин (250 тыс. ед. на 1 литр) и Превикур (2 мл на 1 литр). Закрытые чашки помещали в холодильник с температурой 5 ± 1 °C. Через 7 суток подсчитывали процент проросших семян [18].

Затем проросшие и непроросшие семена отдельно высаживали в ящики в условиях фитотрона при оптимальной температуре. На стадии второй пары настоящих листьев подсчитывали долю растений с маркерным признаком «дихотомическое жилкование». Сравнивали опытные и контрольные популяции F_2 , сформированные совместно из проросших и не проросших на холоде семян, и опытные и контрольные популяции F_2 , сформированные лишь из проросших на холоде семян. Существенность отличий оценивали с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Для определения влияния гаметофитного отбора на холодоустойчивость расщепляющихся популяций F_2 сравнивали процент прорастания семян, полученных с использованием выдержанной при пониженной температуре пыльцы, и процент прорас-

тания семян, полученных после опыления растений свежесобранной пылью, в условиях пониженной температуры в холодильнике.

В результате проращивания при пониженной температуре семян F_2 , полученных после опыления свежесобранной пылью, в комбинации скрещивания «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» из 365 семян проросло 269, что составило 73,7 %. В опытном варианте, при использовании в опылении пыльцы, хранившейся на холоде в течение 7 суток, проросло 364 семени из 415, то есть 87,7 %, что значительно превышало контрольное значение. В обратной комбинации скрещивания «*xantha*» × «дихотомическое жилкование» наблюдалась аналогичная закономерность. Если в контроле из 543 семян проросло 114, то в опыте из 276 семян проросло 160, что составляет 21,0 и 58,0 % соответственно (рис.). Разница между опытом и контролем в данном случае была более существенна, чем в предыдущей комбинации скрещивания. Таким образом, проведение гаметофитного отбора было результативным и привело к увеличению холодоустойчивости расщепляющихся популяций спорофитов F_2 .



Рис. Влияние хранения пыльцы гибридов F_1 при пониженной температуре на холодоустойчивость популяций F_2 подсолнечника

Прим. * — различия существенны на 0,001 уровне значимости

Выдерживание пыльцы гибридов F_1 при пониженной температуре также повлияло на частоту встречаемости растений F_2 с признаком «дихотомическое жилкование» (табл.).

Как видно из таблицы, температурная обработка гетерогенной популяции пыльцы гибрида F_1 «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» изменила в F_2 соотношение растений, несущих анализируемый маркерный признак, и без него. При опылении гибридов F_1 пыльцой, хранившейся при температуре 3°C в течение 7 суток, в полученных популяциях F_2 , сформированных из проросших и не проросших при пониженной

температуре семян, доля растений, имеющих отличительный маркерный признак «дихотомическое жилкование», составляла 31,7 %, что на 9,9 % было выше, чем в популяции F_2 , полученной после опыления свежесобранной пылью. Сходный результат наблюдали и при анализе популяций F_2 , сформированных лишь из проросших при пониженной температуре семян. В опытной популяции частота растений с маркерным признаком превышала аналогичный показатель в контроле на 11,5 %. Таким образом, можно говорить о том, что такая обработка пыльцы насыщала расщепляющиеся популяции F_2 генотипами, несущими маркерный признак «дихотомическое жилкование».

Таблица

Влияние выдерживания пыльцы гибрида F_1 комбинации скрещивания «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» при пониженной температуре на частоту растений с маркерным признаком «дихотомическое жилкование» в популяциях F_2

Обработка пыльцы гибрида F_1	Фенотипы F_2		
	всего, шт.	с маркерным признаком	
		количество, шт.	частота, %
Популяции F_2 , сформированные из проросших и не проросших при пониженной температуре семян			
Контроль (опыление свежесобранной пылью)	229	50	21,8±2,73
Опыт (опыление пылью, хранившейся при температуре 3 °С в течение 7 суток)	357	113	31,7±2,46**
Популяции F_2 , сформированные из проросших при пониженной температуре семян			
Контроль (опыление свежесобранной пылью)	202	41	20,3±2,83
Опыт (опыление пылью, хранившейся при температуре 3 °С в течение 7 суток)	340	108	31,8±2,53**

Примечание: ** — различия существенны на 0,01 уровне значимости.

Тот факт, что в результате проведения гаметофитного отбора увеличивается холодоустойчивость спорофитных популяций F_2 и одновременно в них увеличивается количество растений, несущих маркерный признак «дихотомическое жилкование», позволяют констатировать, что ген, детерминирующий признак «дихотомическое жилкование», хотя бы частично сцеплен с локусами, отвечающими за холодоустойчивость у подсолнечника.

Выводы. Опыление выдержанной в течение 7–8 суток при пониженной (3±1°C) температуре пылью гибридов F_1 по сравнению с опылением свежесобранной пылью увеличивает холодоустойчивость спорофитных популяций F_2 , на что указывает лучшее прорастание семян в опытных вариантах при пониженной температуре.

Проведение гаметофитного отбора увеличивает в популяциях F_2 долю растений, несущих маркерный признак «дихотомическое жилкование».

Ген, отвечающий за маркерный признак «дихотомическое жилкование», хотя бы частично сцеплен с локусами, детерминирующими холодоустойчивость подсолнечника.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яровые масличные культуры / [Шпаар Д., Адам Л., Гтнапп Х. и др.]; Под общ. ред. В. А. Щербакова. — Минск: ФУАинформ, 1999. — 283 с.
2. Гончаров С. В. Селекция линий и гибридов подсолнечника на скороспелость / С. В. Гончаров // Масличные культуры: Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. — 2011. — № 2 (148–149). — С. 27–30.
3. Skoric D. Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses / D. Skoric // HELIA. — 2009. — V. 32, № . 50. — P. 1–16.
4. Fernandez Paula. Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis / [Paula Fernandez, Julio Di Rienzo, Luis Fernandez, H Esteban Hopp, Norma Paniego, Ruth A Heinz] // BMC Plant Biology. — 2008. — 8:11. — P. 1–18. — <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/11>
5. Сиротин А. А. Элементы водного режима подсолнечника в зависимости от факторов среды / Сиротин А. А., Сиротина Л. В., Трифонова М. Ф. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. — 2007. — Т. 5, № 5. — С. 25–28.
6. Lyakh V. Pollen storage at low temperature as a procedure for the improvement of cold tolerance in spring rape, *Brassica napus* L. / Lyakh V., Soroka A., Kalinova M. // Plant breeding. — 1998. — V. 117, № 4. — P. 389–391.
7. Калинова М. Г. Влияние отбора в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок гибридов F_1 на холодоустойчивость потомства у ярового рапса / Калинова М. Г., Сорока А. И., Лях В. А. // Цитология и генетика. — 1998. — № 5. — С.41–47.
8. Мищенко Л. Ю. Селекция холодоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного / Мищенко Л. Ю., Сорока А. И., Лях В. А. // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. — Запоріжжя: ІОК УААН, 1998. — С. 34–38.
9. Лях В. А. Эффективность микрогаметофитного отбора на устойчивость кукурузы к температурному фактору / В. А. Лях, А. И. Сорока // Сельхоз. биол. — 1993. — № 3. — С. 38–44.
10. Пивоваров В. Ф. Перспективы развития приоритетных направлений в селекции и семеноводстве овощных культур / Пивоваров В. Ф., Балашова Н. Н., Балашова И. Т. // Сельскохозяйственная биология. — 2003. — № 3. — С. 3–10.
11. Clarke Heather J. Pollen selection for chilling tolerance at hybridisation leads to improved chickpea cultivars / Heather J. Clarke, Tanveer N. Khan, Kadambot H. M. Siddique // Euphytica. — 2004. — V. 139, Is. 1. — P. 65–74.
12. Кравченко А. Н., Лях В. А., Тодераш Л. Г. и др. Методы гаметной и зиготной селекции томатов. — Кишинёв: Штиинца, 1988. — 152 с.

13. Eva Domínguez. Breeding tomato for pollen tolerance to low temperatures by gametophytic selection / Eva Domínguez, Jesús Cuartero, Rafael Fernández-Muñoz // *Euphytica*. — 2005. — Volume 142, Issue 3. — P. 253–263.
14. Кильчевский А. В. Гаметная селекция томата на холодоустойчивость / А. В. Кильчевский, И. Г. Пугачёва // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. — 2002. — № 4. — С. 35–39.
15. Кильчевский А. В. Результаты циклической гаметофитной и спорофитной селекции томата на холодостойкость и продуктивность / Кильчевский А. В., Антропенко Н. Ю., Пугачева И. Г. // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*. — 2007. — № 2. — С. 53–57.
16. Пивоваров В. Ф. Современные тенденции в селекции овощных культур. Доклад на I Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы», ВНИИСОК, август 2008 / В. Ф. Пивоваров // *Овощи России*. — 2008. — № 1–2. — С.26–29.
17. Лях В. А. Индуцированный мутагенез масличных культур / Лях В. А., Полякова И. А., Сорока А. И. — Запорожье: ЗНУ, 2009. — 266 с.
18. Практикум по росту и устойчивости растений: учебное пособие / [Полевой В. В., Чиркова Т. В., Лутова Л. А. и др.]; Под ред. В. В. Полевого, Т. В. Чирковой. — СПб.: С.-Петербург. ун-т, 2001. — 212 с.

Поступила в редакцию 19.08.2014

UDC 633.854.78:631.5:581.1

Totsky I. V., Lyakh V. O. Zaporizhzhya national university

MICROGAMETOPHYTIC SELECTION AS A TECHNIQUE TO INCREASE THE COLD RESISTANCE OF SUNFLOWER

The influence of F_1 hybrids pollen storage at low temperature on the cold resistance of sporophytic F_2 populations was studied in sunflower. The effect of gametophytic selection on the percentage of plants with «dichotomous venation» marker trait in F_2 populations was also analyzed. The F_1 hybrids of «dichotomous venation» × «*xantha*» and «*xantha*» × «dichotomous venation» cross combinations were used as a material for research. The «dichotomous venation» line was more cold resistant than «*xantha*» line. «Dichotomous venation» mutant sample carries the marker trait of leaf venation, which is characterized by a dense network of the fan-shaped veins. This marker trait is easily identified at the early stages of development. F_1 hybrids pollen was stored at $3\pm 1^\circ\text{C}$ for a period of 7–8 days to carry out the gametophytic selection. Previously castrated F_1 hybrid plants of the same cross combination were then pollinated with the pollen stored at low temperature. The F_1 hybrid plants pollinated with fresh pollen were used as a control. To evaluate the sporophytic F_2 populations for cold resistance the seeds were germinated at low temperature ($5\pm 1^\circ\text{C}$) for a period of 7 days. The percentage of seeds germination was cal-

culated. Germinated and not germinated seeds were planted in wooden boxes in the phytotron at the optimal temperature. The percentage of the plants with the «dichotomous venation» marker trait was counted at the stage of the second pair of true leaves. It was established that the gametophytic selection increases the cold resistance of sporophytic F_2 populations. It was shown that the pollen cold treatment increases the percentage of the F_2 plants with the «dichotomous venation» marker trait. It is assumed that the gene which is responsible for the «dichotomous venation» marker trait is at least partially linked with the loci that determine the cold resistance in sunflower.

УДК 633.854.78:631.5:581.1

Тоцький І. В., Лях В. О.

МІКРОГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР ЯК СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ У СОНЯШНИКА

Вивчали вплив витримування пилку гібридів F_1 соняшника культурного при зниженій температурі на холодостійкість спорофітних популяцій F_2 . Також аналізували вплив гаметофітного добору на частку рослин F_2 , що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування». Матеріалом дослідження були гібриди двох комбінацій схрещування — «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» та «*xantha*» × «дихотомічне жилкування». Лінія «дихотомічне жилкування» була більш холодостійкою, ніж лінія «*xantha*». Мутантний зразок «дихотомічне жилкування» несе маркерну ознаку зміненого жилкування листка, що характеризується більш густою сіткою в'ялоподібно розташованих жилок. Дана маркерна ознака добре ідентифікується на ранніх стадіях розвитку рослини. Для проведення гаметофітного добору пилок гібридів F_1 витримували при температурі $3 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 7–8 діб, а потім запилювали ним раніше кастровані гібридні рослини тієї ж комбінації схрещування. В якості контролю використовували рослини F_1 , запилені свіжозібраним пилом. Оцінку спорофітних популяцій F_2 на холодостійкість проводили шляхом пророщування насіння при зниженій температурі ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) протягом 7 діб. Потім підраховували процент насіння, що проросло. Проросле та не проросле насіння окремо висаджували у ящики в умовах фітотрону при оптимальній температурі. На стадії другої пари справжніх листків підраховували кількість рослин з маркерною ознакою «дихотомічне жилкування». Встановлено, що гаметофітний добір збільшує холодостійкість спорофітних популяцій F_2 . Проведення гаметофітного добору також збільшує частку рослин F_2 , що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування». Виходячи з вище наведеного, можна констатувати, що ген, який відповідає за маркерну ознаку «дихотомічне жилкування», хоча б частково зчеплений з локусами, що детермінують холодостійкість соняшника.