

## ПЫЛЬЦЕВОЙ ОТБОР КАК СПОСОБ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СЕЛЕКЦИИ МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР

В.А. Лях, А.И. Сорока<sup>1</sup>

*Запорожский национальный университет  
<sup>1</sup>Институт масличных культур НААН*

Представлены результаты исследований по разработке методов микрогаметофитного отбора у масличных культур. Показано, что прогревание пыльцы, взятой у гибридных растений, увеличивает засухоустойчивость спорофитных популяций F<sub>2</sub> у льна масличного, а у подсолнечника — жаростойкость образуемого потомства. Выдерживание гетерогенной популяции пыльцы при пониженной температуре, также как и проращивание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в условиях пониженной температуры, способствуют насыщению популяций спорофитов холодоустойчивыми генотипами ярового рапса. Выявлена эффективность технологии по отбору на микрогаметофитном уровне устойчивых к фузариозу генотипов клещевины. Разработанные методы позволяют ускорять процесс создания селекционного материала масличных культур, устойчивого к абиотическим и биотическим факторам среды.

**Ключевые слова:** масличная культура, пыльца, микрогаметофитный отбор, абиотический фактор, биотический фактор.

**Введение.** Ускорение создания высокоурожайных сортов и гибридов является одной из важных проблем в селекции любой сельскохозяйственной культуры. Во многом длительность селекционного процесса обусловлена отсутствием простых и надежных методов оценки и отбора ценных генотипов на различных его этапах.

В решении данного вопроса немаловажная роль отводится отбору на микрогаметофитном уровне. Принципиальная возможность проведения такого отбора основывается на значительной выраженности части спорофитного генома в гаплоидной фазе развития растения [1].

Мужской гаметофит (пыльца) имеет ряд особенностей, которые позволяют с успехом использовать его в селекционных программах. Микроскопические размеры пыльцы предоставляют возможность анализировать большое количество генотипов, а гаплоидное состояние генома, в отличие от диплоидного, позволяет обнаружить как редкие рецессивные аллели, так и адаптивные признаки, контролируемые большим количеством локусов. Эти особенности составляют существенное преимущество гаметофитного отбора над традиционными методами [1, 2].

Наряду с разработкой методов микрогаметофитного отбора, не менее актуальным является разработка методов оценки качества спорофита по его мужскому гаметофиту. Принципиальная возможность создания таких методических приемов также основывается на экспрессии значительной части генов генома спорофита в гаметофите. Преимуществом предлагаемых методов оценки является возможность их использования на самых ранних этапах

селекционного процесса, особенно, когда селекционный материал количественно максимально ограничен. Оценка на уровне пыльцы может представлять и самостоятельный интерес, поскольку чувствительность к тому или иному фактору самой репродуктивной системы растения является весьма важным признаком для многих сельскохозяйственных культур [3].

Экспериментальные исследования, проведенные на различных культурах в 1980-1990 годах, показали, что гаметофитный отбор эффективен по таким признакам как устойчивость к повышенной и пониженной температуре, засолению у томата, повышенной температуре у хлопчатника, повышенной и пониженной температурам, гербицидам у кукурузы и др. [4-6]. Практически полное отсутствие информации по рассматриваемому вопросу на масличных культурах, послужило толчком для разработки методов микрогаметофитного отбора у рапса, льна, подсолнечника, клещевины, являющихся важными объектами сельского хозяйства во многих странах.

**Материал и методы исследования.** Техника большинства представленных в статье манипуляций с пыльцой масличных культур описана в методических рекомендациях [7]. Для изучения длительности сохранения оплодотворяющей способности пыльцы льна ее выдерживали при температуре  $18\pm 1^\circ\text{C}$  и  $3\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 10 суток. Об оплодотворяющей способности судили по проценту завязавшихся коробочек и их осемененности.

Фоном отбора в  $F_1$  холодоустойчивых генотипов ярового рапса в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок была температура  $3-9^\circ\text{C}$  в течение 2-х суток после нанесения пыльцы на рыльце. Об эффективности отбора судили по проценту проросших на холоде семян  $F_2$ .

Пыльцевую селекцию на холодоустойчивость у подсолнечника осуществляли путем выдерживания пыльцы гибридных растений при температуре  $10^\circ\text{C}$  и  $3^\circ\text{C}$  в течение 10 суток. Образовавшиеся после опыления хранившиеся и свежей пыльцой семена высевали в поле для оценки структуры популяций  $F_2$  по высоте и периоду "всходы-цветение".

Отбор засухоустойчивых генотипов льна на стадии зрелого пыльцевого зерна осуществляли за счет прогревания пыльцы гибридов первого поколения при  $35^\circ\text{C}$  в течение 1-2 часов. После проращивания семян  $BC_1$  на среде с осмотиком определяли процент прорастания и длину зародышевого корешка.

Для оценки влияния на жаростойкость спорофитных популяций пыльцу подсолнечника прогревали при температуре  $60\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1 или 3 часов. О жаростойкости судили по способности семян прорасти после их выдерживания в водяной бане при  $60^\circ\text{C}$  в течение 15 мин [8].

Пыльцевую селекцию на устойчивость клещевины к фузариозному увяданию осуществляли путем нанесения пыльцы на рыльце, предварительно смоченное 10%-ным культуральным фильтратом возбудителя *Fusarium oxysporum* [9].

Для обеспечения опыления ограниченным количеством пыльцы на рыльце кастрированного за день до распускания цветка рапса ярового кончиком препаровальной иглы наносили 5-50 пыльцевых зерен.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Сохранение пыльцой в течение длительного времени своей жизне- и оплодотворяющей способности является важным условием успешного манипулирования мужским гаметофитом. Поэтому у ряда масличных культур нами были изучены возможности сохранения пыльцой вышеуказанных качеств в различных температурных условиях. В

частности, у льна масличного была исследована оплодотворяющая способность пыльцы при ее хранении в комнатных условиях и при пониженной температуре (табл. 1).

Таблица 1

**Оплодотворяющая способность пыльцы льна масличного  
в зависимости от длительности ее хранения при различных температурах  
(данные за 1997-1999 гг.)**

Время хранения пыльцы	Завязываемость коробочек, %		Завязываемость семян, шт.	
	Температура, °С		Температура, °С	
	18±1	3±1	18±1	3±1
	Антарес х (Циан х Антарес)			
Контроль (свежая пыльца)	100.0	100.0	8.2	8.2
3 суток	5.1*	66.7*	3.0*	7.6
7 суток	0.0	69.2*	0.0	8.0
10 суток	0.0	53.3*	0.0	6.4*

Прим. \* – отличия от контроля существенны на 1%-ном уровне значимости.

Исследования показали, что при опылении пыльцой, хранившейся даже непродолжительное время (3 суток) при температуре 18±1°C, наблюдалось существенное снижение как завязываемости коробочек, так и завязываемости семян. Хранение пыльцы при данной температуре более длительное время вызывало полную потерю ее оплодотворяющей способности. В то же время температурный режим 3±1°C позволял сохранять достаточно высокую оплодотворяющую способность пыльцы в течение 10 суток [7]. Выявленные таким образом «временные интервалы жизни» пыльцы позволяли в дальнейшем осознанно манипулировать мужским гаметофитом в экспериментах по пыльцевому отбору.

Основываясь на том, что значительная часть генов, экспрессирующихся в пыльце, экспрессируется также и в спорофите, можно было ожидать, что отбор в гетерогенной популяции микрогаметофитов на устойчивость к какому-либо фактору, например, к холоду или повышенной температуре, должен обеспечить увеличение устойчивости к этому же фактору образующегося поколения спорофитов. Исследования, проведенные на различных масличных культурах, подтвердили это предположение.

Так, у рапса ярового была изучена возможность отбора холодоустойчивых генотипов в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок [7]. Гибридные растения, полученные от скрещивания контрастных по холодоустойчивости образцов, сразу же после опыления собственной пыльцой помещали на фон пониженных температур 3-9°C. Через 2 суток растения помещали в условия оптимума, предварительно удалив рыльце с верхней частью столбика для предотвращения прорастания пыльцы, не проросшей на холоде. В контроле прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок протекали при оптимальной температуре. Результаты прорастивания на холоде семян F<sub>2</sub> представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Действие пониженной температуры в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок гибрида F<sub>1</sub> рапса Днепровский × 0438 на холодоустойчивость (прорастание семян, %) спорофитного поколения F<sub>2</sub> (данные за 1997-2000 гг.)**

Температура в период прорастания пыльцы на рыльце	Время проращивания семян, сут.			
	3	5	10	12
Контроль, 25°C	0	0	0.4±0.38	7.5±1.56
Опыт, 3°C	0	0	1.0±1.03	37.5±5.02*
Опыт, 9°C	6.7±1.62*	8.0±1.76*	8.0±1.76*	27.0±2.88*

\* – отличия от контроля значимы при  $p < 0,001$ .

Как видно из таблицы, опытные популяции значительно превосходили контрольную по способности семян прорасти в условиях пониженной температуры (температура проращивания 2°C). В контроле на 3-и и 5-е сутки проращивания на холоде прорастания семян не наблюдали, на 10-е сутки оно было весьма незначительным, а на 12-е – количество проросших семян в контрольной популяции было ниже, чем в опытных в 3-5 раз.

Таким образом, путем отбора более холодостойких микрогаметофитов на этапе прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок была изменена холодоустойчивость образующегося спорофитного поколения. Данные температурные режимы воздействия на пыльцу легли в основу метода отбора холодоустойчивых генотипов рапса.

Холодоустойчивость спорофитов также может быть усилена за счет опыления выдержанной определенное время при пониженной температуре пыльцой. В качестве примера можно привести данные, полученные на подсолнечнике [10]. В качестве материала использовался гибрид F<sub>1</sub> Лидер × Скороспелый, родительские компоненты которого существенно различались как по холодоустойчивости, так и по ряду других количественных признаков, таких как продолжительность периода “всходы-цветение” и высота растения: сорт Лидер – холодоустойчивый, высокорослый, позднезацветающий; сорт Скороспелый – нехолодоустойчивый, низкорослый, с коротким периодом “всходы-цветение”. Перед опылением пыльцу гибрида выдерживали в холодильнике при температуре 3 и 10°C в течение 7 и 10 суток. В контроле опыление проводили свежесобранной пыльцой. Образовавшиеся семена высевали в грунт для анализа растений по продолжительности периода “всходы-цветение” и высоте (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние холодной термообработки пыльцы подсолнечника в F<sub>1</sub> на распределение растений в популяциях F<sub>2</sub> по некоторым количественным признакам, % (данные за 1999-2000 гг.)**

Вариант	Высота растения, см			Период "всходы-цветение"	
	до 150	151-175	>175	до 60 дней	>60 дней
Контроль	19.4	64.1	16.5	79.3	20.7
3°C, 10 сут	12.4	59.6	28.0*	4.4***	95.6***
10°C, 10 сут	9.5	49.4***	41.1***	54.2***	45.8***

\*, \*\*\* – отличия от контроля значимы при  $p < 0,05$  и  $0,001$  соответственно.

Анализ структуры популяций F<sub>2</sub> показал, что выдерживание пыльцы гибрида F<sub>1</sub> на низкотемпературном фоне существенно увеличивало в них частоту растений с большей высотой и периодом "всходы-цветение". Принимая во внимание, что именно холодоустойчивый родитель (сорт Лидер) данной гибридной комбинации является более высокорослым и поздноцветущим, выявленное изменение структуры популяции F<sub>2</sub> свидетельствовало, что частота растений типа холодоустойчивого сорта Лидер в них значительно выше, чем в контроле.

Эффективность отбора засухоустойчивых генотипов на стадии зрелого пыльцевого зерна продемонстрирована в следующем эксперименте со льном масличным. Пыльцу гибрида K7487 × K7734 подвергали действию температуры 35°C в течение 1-2 часов и затем использовали для бэккроссирования на одного из родителей гибрида. Контроль – опыление свежесобранной пыльцой (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние температурной обработки пыльцы льна в F<sub>1</sub> K7487 × K7734 на проращение семян BC<sub>1</sub> K7487 × (K7487 × K7734) на среде с осмотиком (данные за 1998-2000 гг.)**

Вариант	Проращение семян, %	Длина корешка, мм
Контроль	5.0±2.18	1.8±0.40
60 мин	19.7±3.39***	1.7±0.17
120 мин	34.7±2.57***	2.8±0.28**

\*\* , \*\*\* – отличия от контроля значимы при  $p < 0,01$  и  $0,001$  соответственно.

Как видно из данных таблицы 4, прогревание пыльцы гибридных растений влияло как на процент проращения семян, так и на длину корешка, сформированного на среде с осмотиком. При этом максимальные отличия от контроля наблюдаются в том случае, когда пыльца прогревалась в течение 120 минут. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что отбор в гетерогенной популяции пыльцы, устойчивой к повышенной температуре, позволяет существенно увеличить процент засухоустойчивых генотипов в образующихся популяциях спорофитов [7].

Эффективность приема прогревания зрелой пыльцы для отбора засухоустойчивых генотипов была показана и на других культурах, в частности, клещевине и подсолнечнике.

Что касается подсолнечника, то оказалось, что выдерживание пыльцы при повышенной температуре позволяет также усиливать жаростойкость спорофитного поколения за счет выживания более жаростойких гамет (табл. 5).

В одних случаях, как это имеет место в комбинации скрещивания «virescent» × «xantha», результативным было прогревание пыльцы в течение 60°C в течение 1 часа, тогда как для гибрида с иным родительским составом для достижения эффекта длительность прогревания пыльцы следовало увеличить до 3-х часов [8].

Помимо абиотических факторов мужской гаметофит может селективно реагировать и на биотические, в частности, на токсины, которые выделяют возбудители различных болезней растений.

Таблица 5

**Влияние прогревания пыльцы гибридов F<sub>1</sub> подсолнечника на жаростойкость спорофитных популяций F<sub>2</sub>**  
(данные за 2012-2013 гг.)

Комбинация скрещивания	Обработка пыльцы	Прогретых семян F <sub>2</sub> высеяно, шт.	Семян взошло, шт.	Всхожесть, %
«virescent» × «xantha»	Контроль	414	15	3,6±0,92
	60°C/1 час	144	42	29,2±3,79***
«дихотомическое жилкование» × «обожжённый лист»	Контроль	884	31	3,5±0,62
	60°C/1 час	912	43	4,7±0,70
	60°C/3 часа	605	113	18,7±1,59**

Примечание: \*\*\* – отличия от контроля существенны при  $p \leq 0,001$ .

Исследования по пыльцевой селекции на устойчивость к токсинам гриба *Fusarium oxysporum* были проведены у клещевины. В данном случае селективный фон для прорастающей пыльцы обеспечивали за счет нанесения на рыльца гибридных растений культурального фильтрата определенной концентрации. Изначальную гетерогенность популяции мужских гаметофитов по признаку устойчивости к токсинам гриба обеспечивали вовлечением в скрещивание контрастных по устойчивости к фузариозному увяданию родительских компонентов гибридов (табл. 6).

Таблица 6

**Влияние отбора в F<sub>1</sub> пыльцы, устойчивой к токсинам *Fusarium oxysporum*, на устойчивость к фузариозу растений F<sub>2</sub> клещевины**  
(данные за 2004-2006 гг.)

Вариант	Количество больных растений, %	
	начало цветения	конец вегетации
Хортицкая 1 × Гибрид ранний		
Контроль	21,2±3,93	26,8±4,06
Опыт	7,6±2,39**	16,2±3,32*
Хортицкая 1 × Небраска		
Контроль	54,3±6,59	73,6±5,83
Опыт	27,0±6,48**	53,2±6,91*

Примечание: \*, \*\* – отличия от контроля существенны при  $p \leq 0,05$  и  $0,01$  соответственно.

Результаты исследований показали, что данный методический прием изменял структуру расщепляющихся популяций F<sub>2</sub> [9]. Так, к началу цветения разница в количестве больных растений между контролем и опытом составила 13,6% и 27,3% соответственно в популяциях F<sub>2</sub> комбинаций скрещивания Хортицкая 1 × Гибрид ранний и Хортицкая 1 × Небраска.

© В.А. Лях, А.И. Сорока

В мужском гаметофитном поколении можно проводить не только отбор генотипов устойчивых к биотическим или абиотическим факторам среды. Известно, что значительная генетическая изменчивость, которая является необходимым условием для проведения любого отбора, существует и по скорости роста пыльцевых трубок в оптимальных условиях. Если между скоростью роста пыльцевых трубок и определенными признаками спорофита имеется устойчивая связь, то отбор на уровне гамет приведет к изменению структуры спорофитной популяции.

Из данных литературы было известно, что быстрорастущие пыльцевые трубки способствуют образованию потомства с более ранним развитием [11]. Нами были проведены эксперименты по отбору, в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок, рано зацветающих генотипов у льна и клещевины. У льна для того, чтобы обеспечить участие в оплодотворении лишь наиболее быстрорастущих пыльцевых трубок, через 40-120 мин после опыления удаляли половину пестика. У клещевины наибольшая конкуренция между пыльцевыми трубками наблюдалась, когда пыльцевые зерна наносили на максимально удаленные от завязи концы рылец. Результаты свидетельствовали, что в том случае, когда в оплодотворении принимали участие наиболее конкурентоспособные гаметы, в структуре спорофитной популяции существенно увеличивалась частота рано зацветающих генотипов [12].

Однако быстрый рост пыльцевых трубок и высокая их конкурентоспособность могут быть негативно скоррелированы с ранним цветением, как это, например, наблюдалось нами у рапса ярового. В этом случае для реализации в потомстве большего количества рано зацветающих растений необходимо в процессе опыления-оплодотворения исключить конкуренцию между пыльцевыми зернами. Это достигается нанесением на рыльца небольшого количества пыльцевых зерен. В результате такого "ограниченного" опыления исключается конкуренция между микрогаметофитами и в потомстве реализуются практически все генотипы гамет. Учитывая отрицательную связь между скоростью роста пыльцевых трубок и ранним цветением, в образующейся популяции будет значительно большее количество рано зацветающих растений, чем в случае стандартного опыления, когда на рыльца наносится избыточное количество пыльцевых зерен. Так, использование у двух гибридов ярового рапса приема ограниченного опыления обеспечило в их потомстве в два раза больше растений, которые цвели в наиболее ранние сроки [13].

#### **Выводы**

У рапса, льна масличного и подсолнечника показана эффективность отбора холодо-, жаро- и засухоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении.

На примере клещевины продемонстрирована возможность отбора на уровне пыльцы генотипов, устойчивых к биотическим факторам среды, в частности к фузариозному увяданию.

Установлено, что температурный режим  $3\pm 1^\circ\text{C}$  позволяет пыльце льна сохранять высокую оплодотворяющую способность в течение 10 суток и более.

Разработанные приемы манипулирования пыльцой представляют собой основу методологической базы пыльцевой селекции масличных культур.

#### **Литература**

1. Ottaviano E., Mulcahy D.L. Genetics of angiosperm pollen // *Advances in genetics*, 1989. – Vol.2– P. 61-64.
2. Hormaza J.I., Herrero M. Pollen selection // *Theor. Appl Genet.*, 1992. – Vol 83.– P. 663-672.

3. Лях В.А. Микрогаметофитный отбор и его роль в эволюции покрытосеменных растений // Цитология и генетика, 1995. – Т. 29, № 6. – С. 76-82.
4. Кравченко А.Н., Лях В.А., Тодераш Л.Г. и др. Методы гаметной и зиготной селекции томатов. - Кишинев: Штиинца, 1988. – 152с.
5. Ottaviano E., Sari Gorla M., Mulcahy D.L. Pollen selection: efficiency and monitoring // *Isozymes: Structure, function and use in biol. and medicine.* - Wiley-Liss, Inc., 1990. – P.575-588.
6. Лях В.А., Сорока А.И. Эффективность микрогаметофитного отбора на устойчивость кукурузы к температурному фактору // Сельхоз. биол., 1993. – №3. – С.38-44.
7. Лях В.А., Сорока А.И., Мищенко Л.Ю., Калинова М.Г., Мирошниченко Е.Н. Методы отбора ценных генотипов на уровне пыльцы (Методические рекомендации). – Запорожье: Институт масличных культур УААН, 2000. – 48 с.
8. Lyakh V., Totsky I. Heat tolerance and adaptability to drought can be influenced by pollen selection // *Helia*, 2014. – Vol.37. – P. 77-86.
9. Никонова В.Н., Лях В.А. Влияние отбора в F<sub>1</sub>, устойчивых к токсину *Fusarium oxysporum* микрогаметофитов, на генетическую структуру расщепляющейся популяции спорофитов у клещевины // Вісник ЗНУ, 2005. – №1. – С. 132-136.
10. Гасенко Н.В., Лях В.А. Отбор холодоустойчивых генотипов на стадии зрелой пыльцы у подсолнечника // Збірник наук. праць. – Запоріжжя, 1997. – С. 1-4.
11. Winson J.A., Davis L.E., Stephenson A.G. The relationship between pollen load and fruit maturation and the effect of pollen load on offspring vigour in *Cucurbita pepo* // *Amer. Natur.*, 1987. – Vol.5. – P. 643-656.
12. Lyakh V., Soroka A., Mishchenko L. Flowering time in oil flax can be influenced by microgametophytic selection // *Euphytica*, 2001. – Vol. 118(3). – P. 237-242.
13. Лях В.А., Сорока А.И. Отбор скороспелых генотипов ярового рапса на микрогаметофитном уровне // Сельхоз. биол., 1998. – №3. – С.40-43.

## ПИЛКОВИЙ ДОБІР ЯК СПОСІБ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ СЕЛЕКЦІЇ ОЛІЙНИХ КУЛЬТУР

В.О. Лях, А.І.Сорока

Представлені результати досліджень з розробки методів мікрогаметофитного добору у олійних культур. Показано, що прогрівання пилку, взятого у гібридній рослині, збільшує посухостійкість спорофитних популяцій F<sub>2</sub> у льону олійного, а у соняшнику – жаростійкість нащадків, що утворюються. Витримування гетерогенної популяції пилку при зниженій температурі, також як і проростання пилку і ріст пилкових трубок в умовах зниженої температури, сприяють насиченню популяцій спорофитів холодостійкими генотипами ярого ріпака. Виявлено ефективність технології з добору на мікрогаметофитному рівні стійких до фузаріозу генотипів рицини. Розроблені методи дозволяють прискорювати процес створення селекційного матеріалу олійних культур, стійкого до абіотичних і біотичних факторів середовища.

**Ключові слова:** олійна культура, пилко, мікрогаметофитний добір, абіотичний фактор, біотичний фактор.



## POLLEN SELECTION AS A WAY TO INTENSIFY PLANT BREEDING IN OILSEED CROPS

V. Lyakh, A. Soroka

The results of studies on the development of microgametophytic selection methods in oilseed crops are presented. It is shown that the heating of pollen, collected from hybrid plants, increases the drought resistance of F<sub>2</sub> sporophytic populations in linseed and in sunflower – the heat resistance of the resulting offspring. The storage of a heterogeneous pollen population at a lower temperature, as well as pollen germination and pollen tube growth at low temperatures, favors the enrichment of the sporophytic populations with cold tolerant genotypes in spring rape. The effectiveness of technology on microgametophytic selection for resistance to *Fusarium* wilt in castor is revealed. The developed methods allow to accelerate the process of creating the breeding material resistant to abiotic and biotic environmental factors in oilseed crops.

**Keywords:** oil crop, pollen, microgametophytic selection, abiotic factor, biotic factor.

*Рецензент: Е.Н. Войтович, канд. биол. наук, доцент кафедри садово-паркового господарства и генетики растений Запорожского национального университета.*