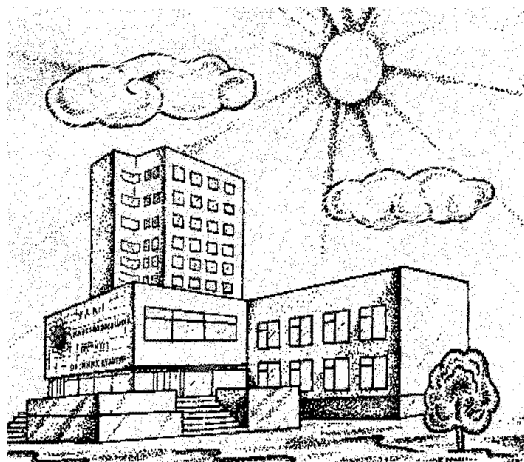


**ИНСТИТУТ МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР
УКРАИНСКОЙ АКАДЕМИИ АГРАРНЫХ НАУК**

МЕТОДЫ ОТБОРА ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ НА УРОВНЕ ПЫЛЬЦЫ

(Методические рекомендации)



Запорожье - 2000

На примере ряда масличных культур продемонстрирована эффективность методов отбора холодоустойчивых, засухоустойчивых и скороспелых генотипов в мужском гаметофитном поколении; освещены методы оценки устойчивости растения к абиотическим факторам среды по его мужскому гаметофиту, а также жирнокислотного состава семян по пыльце; предложены искусственные питательные среды для проращивания пыльцевых зерен и способы сохранения жизне- и оплодотворяющей способности пыльцы.

Рассчитана на специалистов в области генетики и селекции.

Авторы: В.А. Лях, А.И. Сорока, Л.Ю. Мищенко,
М.Г. Калинова, Е.Н. Мирошниченко.

Рецензент: академик УААН, профессор,
доктор биол. наук А.Ф. Стельмах

Печатается по решению ученого совета
Института масличных культур УААН

The methods of selection of valuable genotypes at the level of pollen

V.A. Lyakh, A.I. Soroka, L.Yu. Mishchenko, M.G. Kalinova,
E.N. Miroshnichenko.

The efficiency of techniques for selection of cold tolerant, drought resistant, and early genotypes in the male gametophytic generation was demonstrated for a number of oilseed crops; the methods were elucidated for the evaluation of plant resistance to abiotic environmental factors by its male gametophyte, and fatty acid content of seeds by pollen; the artificial media for pollen grains germination were proposed, as well as methods of preservation of pollen viability and fertilization ability.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ	7
Определение жизнеспособности пыльцы клещевины	7
Определение жизнеспособности пыльцы рапса	9
Определение жизнеспособности пыльцы подсолнечника	10
СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ	12
Сохранение жизне- и оплодотворяющей способности пыльцы рапса ярового при ее выдерживании в условиях пониженной температуры	12
Сохранение оплодотворяющей способности пыльцы льна масличного при пониженной температуре	14
МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ СПОРОФИТА ПО ПЫЛЬЦЕ	16
Оценка холодоустойчивости растений рапса ярового по пыльце	16
<i>по способности пыльцы прорасти и формировать длинные пыльцевые трубки в условиях пониженной температуры</i>	16
<i>по способности пыльцы выдерживать длительное время пониженную температуру</i>	18
Оценка засухоустойчивости спорофита по пыльце у клещевины	19
Оценка содержания олеиновой кислоты в семенах подсолнечника по пыльце	21
МЕТОДЫ ОТБОРА ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ В МУЖСКОМ ГАМЕТОФИТНОМ ПОКОЛЕНИИ	23
Отбор холодоустойчивых генотипов рапса ярового на стадии зрелого пыльцевого зерна	23
Отбор холодоустойчивых генотипов рапса ярового в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок	25
Отбор холодоустойчивых генотипов подсолнечника на стадии зрелого пыльцевого зерна	27
Отбор холодоустойчивых генотипов льна масличного на стадии зрелого пыльцевого зерна	30

Отбор засухоустойчивых генотипов льна масличного на стадии зрелого пыльцевого зерна	32
Отбор засухоустойчивых генотипов клещевины на стадии зрелого пыльцевого зерна	34
Изменение структуры популяции спорофитов у подсолнечника после прогревания пыльцы	36
Отбор ранозацветающих генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного	39
Отбор скороспелых генотипов клещевины в мужском гаметофитном поколении	42
Отбор ранозацветающих генотипов в мужском гаметофитном поколении у рапса ярового	45
ЛИТЕРАТУРА	47

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на очевидные успехи в селекции растений за последние годы, существуют проблемы, которые необходимо решить для ускорения создания высокоурожайных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений. Одной из них является интенсификация процесса селекции, которая, наряду с другими причинами, сдерживается из-за отсутствия простых, но вместе с тем надежных методов оценки и отбора ценных генотипов на различных этапах селекционного процесса.

В решении данной проблемы немаловажная роль отводится отбору на микрогаметофитном уровне. Принципиальная возможность проведения такого отбора основывается на выраженности части спорофитного генома в гаплоидной фазе развития растения, что было подтверждено рядом экспериментальных исследований (Ottaviano, Mulcahy, 1989; Hormaza, Herrero, 1992).

Мужской гаметофит (пыльца) имеет две характерные особенности, которые позволяют с успехом использовать его в селекционных программах - микроскопические размеры и гаплоидный генотип. Первое означает, что в любых условиях проведения исследований, включая, что особенно важно, лабораторные, может быть проанализировано большое количество генотипов. Гаплоидное же состояние генома, в отличие от диплоидного, позволяет обнаружить как редкие рецессивные аллели, так и адаптивные сочетания, контролируемые большим количеством локусов. Отмеченное выше составляет существенное преимущество гаметофитного отбора над традиционными методами селекции. Вследствие этого при применении методов отбора на гаплоидном уровне селекционный процесс может быть в значительной степени интенсифицирован.

Наряду с разработкой методов микрогаметофитного отбора не менее актуальным является разработка методов оценки показателей спорофита по его мужскому гаметофиту. Принципиальная возможность создания таких методических приемов также основывается на экспрессии значительной части генов генома спорофита в гаметофите. К важным преимуществам методов оценки, в основе которых лежит анализ мужского гаметофита, следует отнести возможность их использования на самых ранних этапах селекционного процесса. При этом оценка селекционного материала может быть проведена даже тогда, когда он количественно максимально ограничен. Кроме того, оценка на уровне пыльцы представляет и самостоятельный интерес, так как в значительной степени характеризует чувствительность к тому или

иному фактору самой репродуктивной системы растения, что является весьма важным признаком для многих сельскохозяйственных культур.

К настоящему времени установлено, что гаметофитный отбор эффективен по таким признакам, как устойчивость к повышенной и пониженной температурам, засолению у томата, повышенной температуре у хлопчатника, повышенной и пониженной температурам, а также гербицидам у кукурузы и др.

Практически полное отсутствие информации по рассматриваемой проблеме на масличных культурах послужило толчком для разработки методов микрогаметофитного отбора у подсолнечника, рапса, льна и клещевины, являющихся важными объектами сельского хозяйства во многих странах. Наиболее актуальным и одновременно реально достижимым, на наш взгляд, для них была разработка методов отбора на гаплоидном уровне генотипов устойчивых к абиотическим факторам среды, таким как повышенная и пониженная температура. Предполагалось, что успешным может оказаться микрогаметофитный отбор на скороспелость, поскольку на ряде культур уже была выявлена устойчивая связь между данным признаком и скоростью роста пыльцевой трубки в ткани столбика.

Исследования, проведенные в лаборатории гаметной селекции Института масличных культур УААН в 1993-1999 годах, практическим результатом которых стали методы пыльцевой оценки и отбора, представленные в данных методических рекомендациях, показали результативность селекции в мужском гаметофитном поколении холодо- и засухоустойчивых, а также ранозацветающих генотипов льна масличного, засухоустойчивых и скороспелых генотипов клещевины, холодоустойчивых генотипов подсолнечника и рапса. В дальнейшем спектр методов может быть значительно расширен, где особенно привлекательными для масличных культур являются методы пыльцевой оценки и отбора на устойчивость к болезням и биохимические показатели.

Безусловно, методы микрогаметофитного отбора не следует противопоставлять методам отбора на спорофитном уровне и наилучший результат, вероятно, достигается при их сочетании. Вместе с тем, высокая эффективность методов, в основе которых лежит манипулирование мужским гаметофитом, позволяет рассматривать пыльцу не в качестве пассивного вектора переноса генетической информации, а действительно "инструмента" в руках селекционера.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ

*Для успешной разработки методов оценки и отбора генотипов на микрогаметофитном уровне отправным моментом является способность пыльцы прорасти и расти на искусственной питательной среде, что дает возможность быстро и эффективно оценивать как жизнеспособность пыльцы, так и реакцию мужского гаметофита на то или иное стрессовое воздействие. Использование других подходов для оценки качества пыльцы является проблематичным либо из-за их большой трудоемкости (прорастание пыльцы *in vivo* на рыльцах пестиков), либо получения искаженных результатов (окрашивание пыльцы с помощью различных красителей).*

Определение жизнеспособности пыльцы клещевины

Определение жизнеспособности пыльцы клещевины важно не только при использовании новых методов гаметофитного отбора, основанных на различных манипуляциях с пыльцой, но и для характеристики пыльцевой продуктивности растений, что важно для обеспечения высокой урожайности у данной культуры. Оценка жизнеспособности можно проводить при помощи обычной световой или люминесцентной микроскопии после проращивания пыльцы либо без проращивания, анализируя активность каких-либо жизненноважных ферментов. Для проведения микрогаметофитного отбора первый метод предпочтительнее, поскольку позволяет полнее анализировать реакцию пыльцы на стрессовые факторы.

Поскольку в литературе сведения о проращивании пыльцы клещевины *in vitro* практически отсутствуют, для этих целей нами была разработана питательная среда (Soroaka, 1996) следующего состава:

сахароза - 25%

борная кислота (H_3BO_3) - 0,05%

сульфат магния ($MgSO_4 \times 7H_2O$) - 0,001%.

При таком составе питательной среды прорастает до 90% пыльцевых зерен в зависимости от генотипа. Без ионов магния пыльцевые зерна тоже прорастают (рис. 1), но процент проросшей пыльцы ниже, а пыльцевые трубки меньшей длины и чаще бывают деформированы.

Все компоненты растворяют в дистиллированной воде. Готовую среду хранят в холодильнике, используя по мере надобности. Помутневшую среду заменяют свежей.

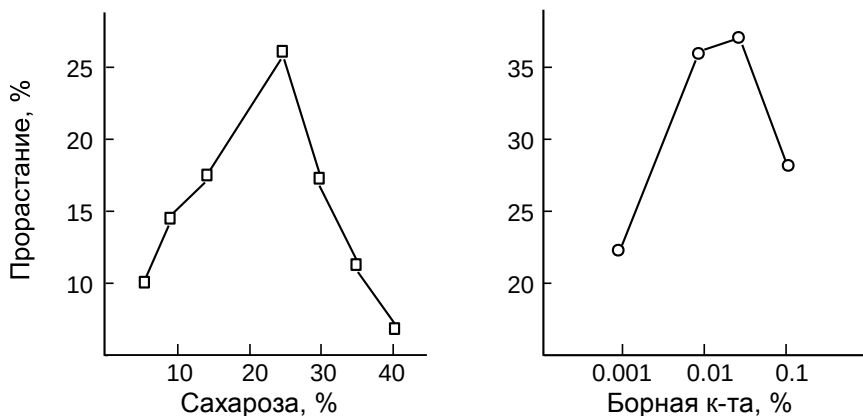


Рис. 1. Прорастание пыльцы клещевины *in vitro* в зависимости от содержания сахарозы и борной кислоты в питательной среде.

Методика оценки жизнеспособности пыльцы следующая. Несколько капель среды распределяют стеклянной палочкой по центральной части поверхности обезжиренного предметного стекла. Свежесобранную пыльцу при помощи препаровальной иглы или скальпеля наносят на поверхность среды (для равномерного распределения пыльцу можно слегка размешать в среде), стекла помещают в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и оставляют в термостате на 3 часа при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ для прорастания.

Затем под микроскопом в центре капли анализируют 300-500 случайно выбранных пыльцевых зерен и рассчитывают процент прорастания по формуле: количество проросших пыльцевых зерен разделить на количество просмотренных пыльцевых зерен и умножить на 100. Пыльцевое зерно считают проросшим, если длина пыльцевой трубки равна как минимум половине диаметра пыльцевого зерна. При необходимости можно определить и длину пыльцевых трубок. Для этого с помощью окуляр-микрометра микроскопа измеряют длину 30-50 случайно выбранных пыльцевых трубок и вычисляют среднее.

Определение жизнеспособности пыльцы рапса

Рапс, как яровой, так и озимый, широко культивируется в некоторых странах Западной Европы, Канаде и все большее распространение получает в Украине. Для создания гибридных форм рапса, разработки новых методов селекции, контроля продуктивности необходимо определять жизнеспособность его пыльцы. Для этой цели было предложено несколько искусственных питательных сред (Hodgkin et al., 1982; Roberts et al., 1983). Среда, которую предлагаем мы, основана на среде Робертса с сотрудниками, но имеет некоторые модификации. Состав ее следующий (грамм на 100мл среды):

сахароза - 25,0
борная кислота (H_3BO_3) - 0,001
хлористый кальций ($CaCl_2$) - 0,018
калий азотнокислый (KNO_3) - 0,01
трис ($C_4H_{11}NO_3$) - 0,1.

Можно воспользоваться и более упрощенным вариантом среды, который, однако, также обеспечивает довольно высокий процент прорастания пыльцы: сахароза - 25,0; борная кислота - 0,001; трис - 0,1 (Soroka, 1996).

Особо следует сказать о роли триса (трисгидроксиметиламинометана). Он обеспечивает необходимое подщелачивание среды. Для обеих сред величина pH среды должна быть 8,5-8,7. Поэтому, в зависимости от чистоты других реагентов и качества дистиллированной воды, количество триса можно существенно изменять. О значении величины pH для прорастания пыльцы рапса можно судить по данным таблицы 1. Видно, что при оптимальной величине pH количество проросшей пыльцы в несколько раз выше, чем на среде с pH 6,05 для обоих генотипов. При отсутствии триса его можно заменить несколькими каплями раствора аммиака, однако в наших опытах пыльца на такой среде росла несколько хуже.

Таблица 1

Влияние величины pH на прорастание пыльцы рапса ярового, %

Генотип	pH 6.05	pH 7.65	pH 8.0	pH 8.4	pH 8.7
UKR 87	28.9±1.43	39.7±1.55***	38.6±1.54***	52.0±1.58***	49.9±1.58***
UKR 67	14.5±1.11	21.7±1.31***	42.4±1.57***	52.8±1.56***	59.8±1.55***

*** - отличия от варианта с pH 6.05 значимы при $P < 0,001$.

Для определения жизнеспособности на предметное стекло наносят несколько капель питательной среды, добавляют туда при помощи препаровальной иглы пыльцу, собранную в день раскрытия цветков (можно и на второй день), слегка размешивают и помещают в термостат на 3-4 часа при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Затем в центре капли просматривают подряд 300-500 пыльцевых зерен и подсчитывают те из них, которые проросли. В случае необходимости измеряют длину 30-50 случайно выбранных пыльцевых трубок. Пыльцевое зерно считают проросшим, если длина пыльцевой трубки равна не менее половины его диаметра. Процент прорастания рассчитывают по формуле: количество проросших пыльцевых зерен деленное на количество просмотренных пыльцевых зерен и умноженное на 100.

Определение жизнеспособности пыльцы подсолнечника

Несмотря на то что подсолнечник является основной масличной культурой Украины, а также ряда других стран, до недавнего времени оценка жизнеспособности его пыльцы велась только непрямими методами. Это было вызвано тем, что не имелось искусственной питательной среды, пригодной для проращивания пыльцы подсолнечника и одновременно доступной по составу. В то же время при работах по оценке пыльцевой продуктивности, качества пыльцы, при проверке жизнеспособности пыльцы межвидовых гибридов, планировании схем гибридизации весьма желательно оценивать жизнеспособность пыльцы, ее устойчивость к стрессовым факторам, скорость роста пыльцевых трубок, реакцию на обработку определенными химическими веществами и т.п. Несколько лет назад была разработана искусственная среда, пригодная для этих целей (Keshava Murthy et al., 1994). Для регулирования осмотического давления в ее состав входит полиэтиленгликоль. Состав этой среды следующий (на 1 л):

сахароза - 150 г

борная кислота (H_3BO_3)- 200 мг

нитрат калия (KNO_3)- 200 мг

сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)- 200 мг

нитрат кальция ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)- 200 мг

экстракт рыльца - 1 шт

ПЭГ 6000 - 296 г.

Питательная среда готовится последовательным растворением компонентов в дистиллированной воде. Затем, для улучшения прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок, в среду добавляется водный экстракт неопыленного рыльца. Можно также сразу готовить среду на водном экстракте рыльца. Кроме того, по нашим данным, увеличение содержания борной кислоты и нитрата кальция до 220мг/л увеличивает процент прорастания пыльцы. Мы также рекомендуем перед посевом пыльцы на среду для проращивания выдержать ее в холодильнике 30 мин. Такая предобработка весьма положительно сказывается на проценте прорастания. В крайнем случае можно просто выдержать пыльцу в закрытой чашке Петри в течение получаса при комнатной температуре.

Определение жизнеспособности пыльцы проводят следующим образом. Пыльцу собирают с недавно открывшихся цветков (8-9 часов утра) в пергаментные пакетики, помещают на полчаса в открытых чашках Петри в холодильник (3-5°C), высевают в каплю среды, нанесенную на предметное стекло, и проращивают в термостате при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3-х часов (иногда достаточно и часа). Затем просматривают 300-500 пыльцевых зерен и определяют количество проросших (тех, у которых пыльцевая трубка равна не менее половины диаметра пыльцевого зерна). При необходимости измеряют длину 30-50 случайно выбранных пыльцевых трубок. Пыльцевые зерна по краю капли стараются не анализировать. Процент прорастания пыльцы определяют по формуле: количество проросших пыльцевых зерен разделить на количество просмотренных пыльцевых зерен и умножить на 100.

Для примера в таблице 2 приведен процент прорастания пыльцы некоторых диких видов подсолнечника. Пыльца культурного подсолнечника прорастает значительно лучше.

Таблица 2

Прорастание пыльцы диких видов подсолнечника

Генотип	Прорастание пыльцы, %
<i>H.decapetalus</i>	12.2
<i>H.maximiliani</i>	35.2
<i>H.mollis</i>	17.1
<i>H.strumosus</i>	50.3

СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ

Сохранение пыльцевыми зернами в течение достаточно длительного отрезка времени своей жизне- и оплодотворяющей способности является одним из важных условий успешного манипулирования мужским гаметофитом. Кроме того, увеличение временного периода использования пыльцы значительно облегчает работу при проведении гибридизации, которая часто ограничивается сроками цветения растений.

В естественных условиях пыльца большинства сельскохозяйственных культур очень быстро теряет свою жизнеспособность, тогда как в экспериментальных - продолжительность жизни пыльцы может быть значительно увеличена. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что хранение свежесобранной пыльцы при определенных условиях обеспечивает ее жизнеспособность на постоянном уровне от нескольких дней и недель до нескольких лет у различных растений. Для длительного хранения пыльцы необходимо соблюдение ряда параметров. К числу основных относятся температура и влажность (Поддубная-Арнольди, 1976).

Сохранение жизне- и оплодотворяющей способности пыльцы рапса ярового при ее выдерживании в условиях пониженной температуры

Для сохранения жизне- и оплодотворяющей способности пыльцы рапса ярового предлагается метод хранения пыльцы при пониженной температуре (Lyakh, Soroka, Kalinova, 1998). Свежесобранную пыльцу помещают в пергаментные пакеты и хранят в стеклянной посуде при температуре 3-10°C и 80-95% влажности воздуха. Предлагаемый метод позволяет использовать пыльцу рапса ярового для опыления после 10-ти суток выдерживания ее при пониженной температуре, например, в холодильнике.

Для иллюстрации эффективности данного приема ниже приведен пример с использованием гибрида F₁ Шпат × 0438 рапса ярового (табл.3). Сбор пыльцы проводили в утренние часы сразу после раскры-

тия цветков. В равных объемах пыльцу помещали в пергаментные пакеты, которые укладывали в стеклянные бюксы. Бюксы ставили на фон низких температур. Пыльцу хранили при температуре 3 и 10°C в течение 25 суток. Через 3, 7 и 10 суток проводили опыление растений. Контролем были растения, опыленные свежесобранной пыльцой.

Оценку жизнеспособности пыльцы проводили путем посева ее на питательную среду перед опылением. По окончании проращивания в центре капли просматривали не менее 500 пыльцевых зерен и подсчитывали те из них, которые проросли. Контролем служила свежесобранная пыльца.

Таблица 3

Влияние длительности хранения пыльцы гибрида F₁ Шпат × 0438 рапса ярового при пониженных температурах на ее жизнеспособность, %

Время хранения пыльцы, сут.	Температура хранения пыльцы, °C	
	3	10
Контроль	57.9±2.14	57.9±2.14
7	55.9±2.16	45.3±2.11***
10	53.8±2.22	43.8±2.19***
25	17.2±1.63***	3.9±0.85***

*** - отличия от контроля значимы при $P < 0,001$.

Как видно из данных таблицы 3, воздействие пониженными температурами в течение 10-ти суток на пыльцу гибрида Шпат × 0438 практически не снижало ее жизнеспособность при 3°C и уменьшало количество проросших пыльцевых зерен лишь на 24,3% при 10°C. Даже через 25 суток довольно большое количество пыльцевых зерен, хранившихся при температуре 3°C, прорастало на питательной среде.

Об оплодотворяющей способности выдержанной при пониженных температурах пыльцы судили по изменению, в сравнении с контролем, осемененности стручков, полученных от опыления хранившейся пыльцой (рис. 2).

Как видно на рисунке 2, хранение пыльцы приводило к снижению осемененности стручков. Однако опыление хранившейся даже в течение 10-ти суток пыльцой позволило получить более 50-ти процентов нормально выполненных семян.

На основании вышеизложенного можно предложить использовать пониженные температуры (до 10°C) для хранения пыльцы рапса ярового.

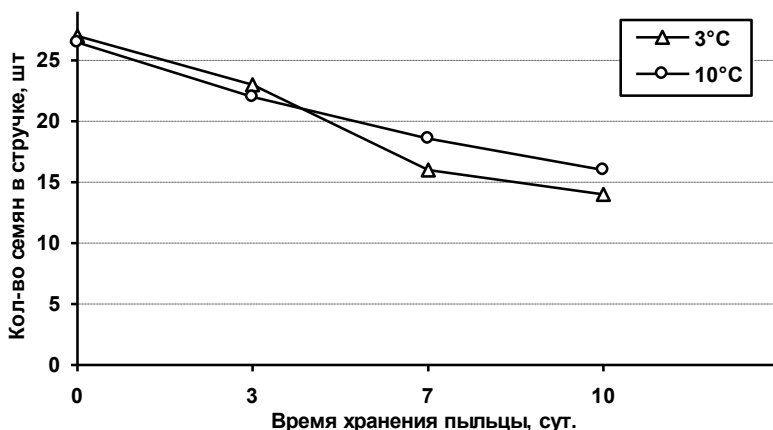


Рис.2. Завязываемость семян в зависимости от длительности хранения пыльцы рапса ярового при пониженной температуре.

Сохранение оплодотворяющей способности пыльцы льна масличного при пониженной температуре

Продолжительность жизни пыльцы у различных растений различна. У одних видов пыльца быстро теряет свою жизнеспособность и перестает прорастать, у других - жизнеспособность пыльцы сохраняется более или менее продолжительный период времени, что облегчает работу по гибридизации. По литературным данным, пыльца льна в тени при температуре 18-20°C сохраняет свою жизнеспособность до 6 суток (Дорофеев и др., 1990).

Для сохранения жизне- и оплодотворяющей способности пыльцы льна масличного можно использовать ее выдерживание при пониженной температуре (Мищенко, Лях, 1997). Выделенную из пыльников раскрывшихся в утренние часы цветков пыльцу помещают на предметное стекло, кладут в чашки Петри и хранят при температуре 3-7°C. Предлагаемый метод позволяет хранить пыльцу в течение 10 суток, при этом оплодотворяющая способность пыльцы сохраняется достаточно высокой.

Подтверждением эффективности данного приема может быть следующий пример: Пыльцу гибрида F₁ Циан × Антарес собирали в утренние часы, тщательно перемешивали и помещали на предметные стекла, распределяя ее монослоем. Часть пыльцы хранили в комнате в темном месте при температуре 18±1°C, вторую - в холодильнике при температуре 3±1°C. Через трое, семь и десять суток часть хранившейся при разной температуре пыльцы использовали для опыления родительских форм данного гибрида. О влиянии температуры хранения на оплодотворяющую способность пыльцы судили по проценту завязавшихся коробочек и их осеменности. В качестве контроля использовали свежесобранную пыльцу.

В результате хранения пыльцы льна масличного при температуре 18±1°C даже непродолжительное время (3 суток) наблюдается существенное снижение как завязываемости коробочек, так и завязываемости семян. Хранение пыльцы при данной температуре более длительное время вызывает полную потерю ее оплодотворяющей способности (табл. 4). В то же время температурный режим 3±1°C позволяет сохранять высокую оплодотворяющую способность пыльцы в течение 10 суток, что подтверждают данные завязываемости коробочек и семян.

Таблица 4

Влияние продолжительности и температуры хранения пыльцы на ее оплодотворяющую способность

Время хранения пыльцы, сут.	Завязываемость коробочек, %		Завязываемость семян, шт.	
	Температура, °C		Температура, °C	
	18±1	3±1	18±1	3±1
<i>Циан × (Циан × Антарес)</i>				
Контроль	100.0	100.0	8.6±0.36	8.6±0.36
3	97.0±2.97	97.0±2.97	7.7±0.39	8.3±0.40
7	0.0***	93.9±4.17	0.0***	7.5±0.45
10	0.0***	97.8±2.19	0.0***	7.7±0.33*
<i>Антарес × (Циан × Антарес)</i>				
Контроль	100.0	100.0	8.2±0.44	8.2±0.44
3	5.1±3.52***	66.7±7.55***	3.0±0.31***	7.6±0.52
7	0.0***	69.2±7.35***	0.0***	8.0±0.41
10	0.0***	53.3±9.11***	0.0***	6.4±0.74*

*, *** - отличия от контроля значимы при P< 0,05 и 0,001 соответственно.

На основании вышеизложенного можно предложить использовать температуру $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ для хранения пыльцы льна масличного.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ СПОРОФИТА ПО ПЫЛЬЦЕ

Ускорение создания новых, улучшенных форм сельскохозяйственных растений в значительной мере зависит от возможности идентификации ценных в хозяйственном отношении генотипов на ранних этапах селекционного процесса. В решении этого вопроса важное значение могут иметь методы оценки качества спорофита по его мужскому гаметофиту, которые основываются на экспрессии большей части генома спорофита в гаплоидной фазе развития растения.

Оценка холодоустойчивости растений рапса ярового по пыльце

по способности пыльцы прорасти и формировать длинные пыльцевые трубки в условиях пониженной температуры

Нами разработан метод оценки холодоустойчивости спорофита рапса ярового, основанный на реакции его мужского гаметофита на действие пониженной температуры (Калинова, Сорока, Лях, 1997). Его суть состоит в том, что сформировавшуюся в нормальных условиях пыльцу либо проращивают на питательной среде при пониженной температуре, либо воздействуют пониженной температурой на растения после нанесения пыльцы на рыльце цветка. К холодостойким на спорофитном уровне генотипам относят те, у которых под действием пониженной температуры прорастание пыльцы и длина пыльцевой трубки (на питательной среде) снижались менее чем на 90% и 50% соответственно, а завязываемость семян - менее чем на 20%.

В качестве примера приведем реакцию мужского гаметофита на действие пониженной температуры у двух контрастных по холодоустойчивости на спорофитном уровне генотипов - линейном образце 0438 и сорте Шпат.

Контрастность данных генотипов по устойчивости к холоду на спорофитной стадии развития подтверждалась различной способностью их семян прорасти при пониженной (6°C) в сравнении с опти-

мальной (25°C) температурой, на что указывает различная степень снижения этого показателя у линии 0438 и сорта Шпат (табл. 5).

Реакцию гаметофита исследуемых образцов на пониженную температуру определяли методом холодового проращивания зрелых пыльцевых зерен, сформировавшихся в оптимальных для ярового рапса условиях. При этом в первом случае пыльцу высевали на питательную среду, культивировали ее при температуре 6°C в течение 16 часов и сравнивали с ее прорастанием при температуре 25°C. Во втором случае пыльцу наносили на рыльца предварительно кастрированных цветков и растения помещали на фон пониженной (11°C) температуры. Через двое суток, удалив верхнюю часть пестика для предотвращения прорастания ранее непроросшей пыльцы, растения переносили в условия оптимума. О реакции гаметофита на пониженную температуру судили по изменению количества завязавшихся семян в стручке в сравнении с вариантом, где прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок в тканях пестика проходили в оптимальных условиях.

Степень снижения показателей признаков спорофита и гаметофита определяли по такой формуле: $(K-O) / K \times 100\%$, где K - величина признака в оптимальных температурных условиях, O - то же при пониженной температуре.

Таблица 5

Степень снижения показателей некоторых признаков спорофита и гаметофита рапса ярового под действием пониженной температуры, %

Анализируемый признак	Г е н о т и п	
	линия 0438	сорт Шпат
<i>Спорофит</i>		
Прорастание семян	82.7	19.0
<i>Гаметофит</i>		
Прорастание пыльцы	97.2	87.4
Длина пыльцевой трубки	69.1	24.5
Завязываемость семян	23.5	-3.4

Суммарные данные о реакции спорофита и гаметофита на действие пониженной температуры представлены в таблице 5. Проведенный корреляционный анализ выявил тесную положительную связь ($r=0.79-0.97$) между холодоустойчивостью гаплоидного и диплоидного поколений у ярового рапса. При этом коэффициенты корреляций наиболее высокими были в том случае, когда о холодоустойчивости

гаметофита судили по способности пыльцы прорасти на питательной среде либо прорасти и расти в тканях столбика.

по способности пыльцы выдерживать длительное время пониженную температуру

Холодоустойчивость растений рапса ярового может быть охарактеризована не только по способности пыльцы расти и прорасти при пониженной температуре, но и по реакции пыльцы на пониженную температуру в процессе ее хранения. С этой целью свежесобранную пыльцу каждого генотипа в равных количествах в течение 7-10 суток выдерживают при пониженной (7-10°C) температуре, после чего высевают на питательную среду и проращивают при оптимальной температуре. Затем проводят сравнение с характеристиками свежесобранной пыльцы высеянной на ту же среду и пророщенной в тех же условиях. Хранившаяся при пониженной температуре даже довольно длительное время пыльца может иметь высокий процент прорастания, однако с увеличением экспозиции существенно уменьшается длина пыльцевой трубки. Причем у холодоустойчивого образца снижение длины пыльцевой трубки значительно меньше, чем у нехолодоустойчивого. В данном случае коэффициент корреляции между холодоустойчивостью гаметофита и спорофита был достаточно высоким и составлял 0.55-0.86, что и явилось основанием для оценки холодоустойчивости растений использовать такой показатель, как степень снижения длины пыльцевой трубки после длительного выдерживания пыльцы при пониженной температуре (Калинова, 1999).

Таблица 6

Влияние длительного хранения пыльцы при пониженной температуре на длину пыльцевой трубки, отн. ед.

Генотип	Свежесобранная пыльца	Хранившаяся пыльца	Степень снижения, %
0438	19.9±1.04	10.4±0.44***	47.9
Днепроvский	24.9±1.09	21.6±1.85	13.1

*** - отличия от контроля (свежесобранная пыльца) значимы при $P < 0,001$.

Пример: свежесобранную пыльцу двух образцов - линии 0438 и сорта Днепровский - объемом по 0.5см³ в пергаментных пакетах выдерживали при температуре 7°C в течение 10 суток в холодильнике, высевали на питательную среду и прорастивали при температуре 25°C в течение 3-х часов. До закладки на хранение пыльцу также высевали на питательную среду. В обоих случаях измеряли длину у 50 случайно выбранных пыльцевых трубок. Степень снижения длины пыльцевой трубки определяли по такой формуле: $(K-O) / K \times 100\%$, где K - средняя длина пыльцевой трубки в контроле, O - то же в опыте (табл. 6).

Из таблицы 6 следует, что сравниваемые образцы характеризуются различной реакцией пыльцы на холодовой стресс в процессе хранения. На основании этой оценки линия 0438 была отнесена к нехолодостойким, а сорт Днепровский - к холодостойким на уровне растения генотипам.

Оценка засухоустойчивости спорофита по пыльце у клещевины

Климатические условия юга Украины часто оказывают неблагоприятное воздействие на рост и развитие клещевины, которая проявляет относительную неустойчивость к засухе и повышенным температурам. Поэтому весьма актуальным при создании высокоурожайных сортов данной культуры является поиск засухоустойчивых генотипов.

Экспресс-методы, основанные на анализе пыльцы, можно отнести к разряду перспективных при оценке спорофита на устойчивость к абиотическим факторам среды, что обусловлено не только выявленной экспериментально экспрессией большого количества генов на обеих стадиях жизненного цикла растения, но и легкостью манипулирования таким материалом, как пыльца.

Установленная нами однотипная реакция гаметофита и спорофита одного и того же генотипа у клещевины на действие засухи (коэффициент корреляции между засухоустойчивостью спорофита и устойчивостью мужского гаметофита к действию повышенной температуры составляет 0,72 - 0,89) позволяет выделять засухоустойчивые генотипы клещевины на уровне пыльцы. Показателем устойчивости пыльцы к повышенной температуре служит степень снижения процента прорастания пыльцы или длины пыльцевой трубки после действия стрессового фактора на зрелые пыльцевые зерна. При обработке пыльцы засухо-

устойчивых генотипов температурой 40°C в течение 1 часа степень снижения процента прорастания пыльцы, как правило, не превышает 25%, при этом длина пыльцевой трубки может практически не изменяться.

В качестве примера можно привести данные по теплоустойчивости пыльцы у двух контрастных по засухоустойчивости генотипов клешевины - сорта Хортицкая 1 и линии K161.

Засухоустойчивость генотипов на диплоидной стадии развития (спорофит) оценивали по методу, основанному на определении осмотического давления клеточного сока рефрактометрическим методом. Для этого диски, вырезанные из листьев, помещают в серию растворов сахарозы различной концентрации (от 0,1^{моль/л} до 1^{моль/л}). По истечении 40 минут пробы вынимают и определяют изменение концентрации растворов с помощью рефрактометра. Выявление концентрации изотонического раствора позволяет рассчитать величину сосущей силы клеток листа (осмотический показатель) и водный потенциал растительной клетки (термодинамический показатель) по формуле:

$$\varphi = R \times T \times C \times i,$$

где φ - водный потенциал, Мпа

R - универсальная газовая постоянная (0,00831 кДж/град. моль)

T - абсолютная температура, (273 + t°C);

C - концентрация изотонического раствора, моль/л;

i - изотонический коэффициент (для неэлектролитов i = 1).

Наиболее высокие отрицательные значения водного потенциала свидетельствуют о максимальной способности ткани сохранять лучшую для нее оводненность, то есть препятствовать пагубному воздействию засухи. Исследуемые нами генотипы показали существенные отличия по реакции клеток на осмотический стресс, позволяя выделить группы с высокой засухоустойчивостью ($\varphi/ = 1,9 - 1,95$), средней ($\varphi/ \equiv 1,4 - 1,5$) и незасухоустойчивые ($\varphi/ = 1,05 - 0,95$).

Для оценки устойчивости мужского гаметофита к повышенной температуре свежесобранную пыльцу, размещенную монослоем на предметном стекле, подвергали температурной обработке 40°C в течение 1 часа, после чего ее высевали на искусственную питательную среду и проращивали в течение 3ч при температуре 25°C. Контролем служила свежесобранная пыльца. Об устойчивости мужского гаметофита судили по степени снижения процента прорастания пыльцы и длины пыльцевой трубки, которую определяли по формуле:

$$(K-O) / K \times 100\%,$$

где К - процент прорастания пыльцы (длина пыльцевой трубки) в контроле; О - то же в опытном варианте.

Оказалось, что у генотипов, спорофит которых характеризуется высокой засухоустойчивостью, степень снижения процента прорастания пыльцы после температурной обработки минимальна, тогда как у незасухоустойчивых линий повышенная температура вызывает более существенное ингибирование прорастания пыльцы (табл. 7). Применяемая нами термообработка выявила также существенные различия между линиями по способности образовывать длинную пыльцевую трубку. После прогревания у генотипов, оцененных на стадии спорофита как засухоустойчивые, подобный экологический стресс вызывал менее существенное снижение длины пыльцевых трубок, чем у незасухоустойчивых образцов.

Таблица 7

Теплоустойчивость пыльцы у контрастных по засухоустойчивости генотипов клещевины

Генотип	Значение водного потенциала клеток листа, Мпа	Степень снижения прорастания пыльцы после прогревания, %	Степень снижения длины пыльцевых трубок после прогревания, %
Хортицкая 1	-1.95	18.8	0.0
K161	-1.05	63.7	20.0

Учитывая вышеизложенное, метод пыльцевой оценки может быть предложен в качестве экспрессного для скрининга устойчивых к засухе образцов клещевины.

Оценка содержания олеиновой кислоты в семенах подсолнечника по пыльце

Говоря о возможности оценки качественных показателей спорофита по пыльце, речь идет, прежде всего, о таких его признаках, как устойчивость к абиотическим и биотическим факторам среды. Вместе с тем недавние исследования показали, что по пыльце можно характеризовать не только чувствительность спорофита к разным стрессам, но и

содержание в семенах масличных культур отдельных жирных кислот (Jourdnren et al., 1996).

Нами показана возможность скрининга высокоолеиновых генотипов подсолнечника по пыльце (Лях, Шегда, 1998). С этой целью проводят жирнокислотный анализ липидного комплекса пыльцы и определяют в нем содержание олеиновой кислоты. У высокоолеиновых генотипов олеиновая кислота в липидах пыльцы, как правило, составляет более 30%, тогда как у низкоолеиновых - 10-15%.

Пример: в качестве материала использовали две линии подсолнечника из коллекции Института масличных культур с низким и высоким содержанием в семенах олеиновой кислоты. По пять семян каждого образца высевали в поле, предварительно оценив их жирнокислотный состав, используя лишь 1/3 каждого семени. В период цветения у всех растений трижды проводили сбор свежей пыльцы (около 50 мг), которую в дальнейшем также анализировали по жирнокислотному составу. Анализ липидов семян и пыльцы проводили методом газожидкостной хроматографии (табл. 8).

Таблица 8

Жирнокислотный состав семян и пыльцы низкоолеиновой и высокоолеиновой линий подсолнечника

Материал, линия	Жирные кислоты					
	C16:0 пальми- тиновая	C18:0 стеари- новая	C18:1 олеино- вая	C18:2 линоле- вая	C18:3 линоле- новая	C20:1 эйкозе- новая
<i>Семена</i>						
Низкоолеиновая	6.3	3.7	8.4	81.6	0	0
Высокоолеиновая	3.6	3.6	90.2	2.6	0	0
<i>Пыльца</i>						
Низкоолеиновая	24.7	10.4	12.4	6.9	22.0	23.6
Высокоолеиновая	12.8	14.2	38.8	3.4	11.2	19.6

Несмотря на то что в липидном комплексе гаметофита (пыльца) в отличие от спорофита (семена) имеется больший набор жирных кислот, содержание олеиновой кислоты в пыльце высокоолеиновой (по спорофиту) линии было значительно большим, чем у низкоолеиновой. В данном случае превышение составляло более 3-х раз. Обнаруженная связь между гаметофитным и спорофитным поколениями по содержа-

нию олеиновой кислоты позволяет проводить более ранний, чем это обычно делается, скрининг высокоолеиновых генотипов подсолнечника.

МЕТОДЫ ОТБОРА ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ В МУЖСКОМ ГАМЕТОФИТНОМ ПОКОЛЕНИИ

В результате проведения экспериментов различными группами исследователей было установлено, что от 60% до 80% структурных генов экспрессирующихся в пыльце, экспрессируются также и в спорофите (Hormaza, Herrero, 1992). Поэтому можно 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.

Отбор холодоустойчивых генотипов рапса ярового на стадии зрелого пыльцевого зерна

На основании собственных экспериментальных данных нами предложен способ повышения холодоустойчивости рапса ярового, основанный на отборе пыльцы, устойчивой к пониженной температуре (Лях, Калинова, Сорока, 1997).

В качестве исходного материала используют гибриды рапса, родительские формы которых различаются по холодоустойчивости на уровне гаметофита (для обеспечения генетической гетерогенности).

Сбор пыльцы проводят сразу после раскрытия цветков. Сбранную пыльцу тщательно перемешивают, в равных объемах помещают в пергаментные пакеты, которые укладывают в боксы и в боксах ставят на фон пониженных температур. Например, в холодильник при температуре 3°C на 7-10 дней. При необходимости длительность температурной обработки и температурный режим корректируют экспериментальным путем. После выдерживания пыльцы при пониженной температуре проводят опыление. Предварительно, за сутки до опыления растений, проводят кастрацию цветков путем удаления 2-х коротких и 4-х длинных тычинок. Для кастрации выбирают цветки в фазе зелено-желтого бутона. Откастрированные бутоны изолируют, например, ватой. В результате хранения при пониженных температурах пыльца нехолодостойких генотипов погибает и в оплодотворении принимают участие только холодостойкие гаметы. Это приводит к повышению холодоустойчивости образующейся популяции растений.

Холодоустойчивость растений полученной расщепляющейся популяции можно определить в лабораторных условиях по способности семян прорасти в условиях пониженных температур.

Пример: для проведения отбора был взят гибрид F₁ Шпат × 0438. У данного гибрида был проведен микрогаметофитный отбор по указанной методике. Наличие отбора определяли по снижению длины стручков и количеству семян в них после опыления термически обработанной пылью. В контроле опыление проводили свежесобранной пылью (табл. 9).

Таблица 9

Влияние температурной обработки пыльцы в F₁ на длину стручка и его осемененность

Время хранения пыльцы, сут.	Температура хранения пыльцы, °С			
	3		10	
	Длина стручка, см	Количество семян в стручке, шт	Длина стручка, см	Количество семян в стручке, шт
Контроль	6.0±0.12	26.9±0.56	6.0±0.12	26.9±0.56
3	5.4±0.12***	22.5±0.90***	5.5±0.24	21.5±1.28***
7	3.9±0.11***	15.3±1.00***	4.3±0.10***	18.7±1.27***
10	4.2±0.18***	14.4±1.70***	4.5±0.09***	15.7±1.04***

*** - отличия от контроля значимы при $P < 0,001$.

Как видно из данных таблицы 9, опыление растений хранившейся пылью существенно влияло как на длину стручка, так и на его осемененность, что свидетельствует о гибели части гамет в процессе хранения при пониженной температуре.

Эффективность отбора определяли путем проращивания семян популяции F₂ контрольных и опытных вариантов при пониженной температуре 3°С в лабораторных условиях (табл. 10).

Как видно из данных таблицы 10, опытные варианты значительно превосходят контроль по способности семян прорасти в условиях пониженной температуры. Причем температура 3°С действует эффективнее, чем 10°С. Таким образом, отбор более холодоустойчивых гамет в процессе хранения позволил насытить опытную популяцию F₂ более холодоустойчивыми генотипами.

Таблица 10

Прорастание при пониженной температуре семян F_2 , полученных после опыления гибрида Шпат $\times$ 0438 хранившейся пыльцой, %

Время хранения пыльцы, сут.	Температура хранения пыльцы, °С	
	3	10
Контроль	10.9 $\pm$ 1.60	10.9 $\pm$ 1.60
3	8.6 $\pm$ 1.80	8.5 $\pm$ 1.71
7	31.5 $\pm$ 3.18***	27.3 $\pm$ 3.07***
10	85.0 $\pm$ 4.49***	36.4 $\pm$ 3.16***

*** - отличия от контроля значимы при $P < 0,001$.

Приведенный пример позволяет сделать вывод об эффективности отбора по холодоустойчивости на стадии зрелого пыльцевого зерна и целесообразности его применения в селекционной практике.

Отбор холодоустойчивых генотипов рапса ярового в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок

По аналогии с методом отбора холодоустойчивых генотипов на стадии зрелого пыльцевого зерна, отбор в гетерогенной по устойчивости к пониженной температуре популяции микрогаметофитов в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок обеспечивает изменение холодоустойчивости образующегося поколения спорофитов (Калинова, Сорока, Лях, 1998).

Для проведения данного отбора предварительно проводят кастрацию цветков (от 20-ти до 50-ти на каждом растении), откастрированные бутоны изолируют ватными тампонами от проникновения насекомых-опылителей. Через сутки после кастрации с новых раскрывшихся цветков проводят сбор пыльцы, которую тщательно перемешивают и опыляют нею ранее кастрированные цветки. Сразу после опыления растения опытных вариантов помещают на фон пониженных температур 3-9°C. Через 2-е суток растения помещают в условия оптимума, предварительно удалив рыльце с верхней частью столбика для предотвращения прорастания пыльцы непроросшей на холоде. Таким образом, прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок в опытных вариантах проходит в условиях пониженных температур. Действие данного фактора в указанный период позволяет отселектировать

наиболее холодоустойчивые микрогаметофиты, которые первыми до-
растут до завязи и примут участие в оплодотворении. О наличии отбора
судят по снижению длины стручка и его осемененности, а об эффек-
тивности отбора соответственно по повышению холодоустойчивости
популяции F₂. Холодоустойчивость популяции F₂ определяют в лабора-
торных условиях (холодовое проращивание семян), а также в теплич-
ных - при раннем посеве в грунт (температура почвы не более 2-4°C).

Пример: для проведения отбора был взят гибрид F₁ Днепроvский
× 0438. У данного гибрида провели отбор холодоустойчивых гамет
предложенным методом. Прорастание пыльцы и рост пыльцевых тру-
бок в условиях пониженных температур привели к значительному сни-
жению длины стручка и его осемененности, что свидетельствовало о
факте отбора. В таблице 11 приведены данные об эффективности отбо-
ра.

Таблица 11

Действие пониженной температуры в период прорастания пыльцы и
роста пыльцевых трубок гибрида F₁ Днепроvский × 0438 на
холодоустойчивость спорофитного поколения F₂
(прорастание семян, %)

Вариант	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 данных таблицы 11, опытные популяции значи-
тельно превосходят контрольную по способности семян прорасти в
условиях пониженной температуры (температура проращивания 2°C).
В контрольной популяции гибрида Днепроvский × 0438 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 в зависимости от температурного фона, примененного к мик-
рогаметофитам.

Опытные популяции также значительно превосходили контроль-
ную по количеству всходов при раннем посеве в условиях теплицы
(табл. 12).

Таблица 12

Влияние пониженной температуры в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок гибрида F₁ Днепровский × 0438 на холодоустойчивость спорофитной популяции F₂ при раннем посеве в условиях теплицы

Вариант	Всходы семян, %		
	13-е сутки	15-е сутки	18-е сутки
Контроль, 25°C	2.9±1.18	53.7±3.49	99.1±0.66
Опыт, 9°C	8.3±1.36**	64.4±2.36**	98.0±0.69
Опыт, 3°C	3.1±1.15	64.0±3.18**	99.6±0.42

** - отличия от контроля значимы при $P < 0,01$.

Итак, приведенный пример позволяет сделать выводы об имевшем месте отборе более холодоустойчивых генотипов при действии низких положительных температур в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок гибридов F₁. Это подтверждает большая холодоустойчивость популяций F₂ опытных вариантов по сравнению с контролем как при холодовом проращивании семян, так и при раннем посеве в грунт в условиях теплицы. Таким образом, путем отбора более холодоустойчивых микрогаметофитов на этапе прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок можно изменить холодоустойчивость образующегося спорофитного поколения. Предложенный метод является эффективным и может использоваться в селекционной практике.

Отбор холодоустойчивых генотипов подсолнечника на стадии зрелого пыльцевого зерна

Одним из направлений в селекции подсолнечника является создание сортов и гибридов, устойчивых к воздействию неблагоприятных абиотических факторов среды. В этой связи перспективным может быть метод микрогаметофитного (пыльцевого) отбора, в основе которого лежит уже доказанное многочисленными исследованиями существование высокой положительной корреляции между устойчивостью гаметофита и спорофита к различным стрессовым воздействиям.

Нами разработан способ отбора холодоустойчивых генотипов подсолнечника в мужском гаметофитном поколении (на стадии зрелой

пыльцы). Его суть состоит в выдерживании гетерогенной (по холодоустойчивости) популяции зрелых пыльцевых зерен при низких положительных температурах 7-10°C в течение 7-10 суток и последующем использовании этой пыльцы для опыления. В результате образующаяся популяция спорофитов значительно в большей степени насыщается холодоустойчивыми генотипами, чем это происходит при опылении свежесобранной пылью (Гасенко, Лях, 1997). Использование такой методики существенно облегчает работу селекционера по скринингу ценных, в данном случае холодоустойчивых, образцов данной культуры.

В качестве примера можно привести данные, полученные на гибриде F₁ Лидер × Скороспелый. Родительские компоненты гибрида 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”.

Для проведения отбора в F₁ свежесобранную пыльцу объемом по 0.5 см³ помещали в пергаментные пакетики и выдерживали в холодильнике при температуре 3 и 10°C в течение 7 и 10 суток, после чего использовали для самоопыления гибрида. В контроле опыление проводили свежесобранной пылью (табл.13). В дальнейшем семена опытных и контрольной популяций F₂ делили на две части. Половину оценивали по холодоустойчивости на ранних стадиях развития растения используя метод холодого проращивания семян. Другую часть семян высевали в грунт для анализа растений по продолжительности периода “всходы-цветение” и высоте.

Таблица 13

Влияние температурных обработок пыльцы в F₁ на среднюю длину зародышевого корешка семян в F₂, мм

Время хранения пыльцы, сут.	Температура хранения пыльцы, °C	
	3	10
Контроль	1.6	1.6
7	2.6***	2.6***
10	2.4***	2.3***

*** - отличия от контроля значимы при P < 0,001.

Данные, приведенные в таблице 13, показывают, что во всех опытных вариантах обнаружена лучшая способность семян формировать длинные зародышевые корешки в сравнении с контролем.

Различия между контрольным и опытными вариантами выражались также в изменчивости растений по ряду других признаков, таких как высота и период "всходы-цветение" (табл. 14).

Таблица 14

Влияние термообработок пыльцы в F_1 на распределение растений в популяциях F_2 по некоторым количественным признакам, %

Вариант	Высота, 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_2 показывает, что предварительное выдерживание пыльцы гибрида F_1 на низкотемпературном фоне существенно увеличивает в них частоту растений с большей высотой и периодом "всходы-цветение". При этом средняя высота растения в контрольной популяции была 164 см, а в опытных, где пыльцу хранили на холоде в течение 10 суток при температуре 3 и 10°C, 170 и 173 см, соответственно. Аналогично средний период "всходы-цветение" также был большим в опытных вариантах. Принимая во внимание, что именно холодоустойчивый родитель (сорт Лидер) данной гибридной комбинации является более высокорослым и поздноцветущим, увеличение средней высоты растения и периода "всходы-цветение" в опытных популяциях указывает на то, что частота растений типа холодоустойчивого сорта Лидер здесь значительно выше, чем в контроле.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выдерживание гетерогенной популяции пылевых зерен при пониженной температуре приводит к значительному увеличению частоты холодоустойчивых генотипов в образующейся от опыления этой пылью популяции спорифитов.

Отбор холодоустойчивых генотипов льна масличного на стадии зрелого пыльцевого зерна

Предлагаемый способ отбора холодоустойчивых генотипов льна масличного на стадии зрелого пыльцевого зерна основан на дифференциальной чувствительности мужских гаметофитов к пониженной температуре. Необходимым условием эффективности влияния отбора микрогаметофитов на спорофитное поколение является наличие положительной корреляции между устойчивостью спорофита и гаметофита к пониженной температуре.

Для проведения отбора можно использовать гибридные растения, родительские формы которых существенно отличаются по холодоустойчивости. Кастрация бутонов и сбор пыльцы проводится по общепринятой методике. Собранная пыльца монослоем размещается на предметном стекле и в чашках Петри хранится в холодильнике при температуре 3-7°C в течение 7-10 суток, после чего используется для опыления. В результате в опылении принимают участие главным образом холодоустойчивые гаплоидные генотипы (пыльца), сохранившие свою жизне- и оплодотворяющую способность при выдерживании на холоде (Мищенко, Сорока, Лях, 1998).

Пример: на гибриде F₁ Антарес × Циан был проведен микрогаметофитный отбор по вышеописанной методике. В результате было получено поколение ВС₁ Циан × (Антарес × Циан). В контрольном варианте опыление проводили свежесобранной пыльцой. Образовавшиеся семена контрольного и опытных вариантов прорастивали при пониженной температуре. Об эффективности отбора судили по способности семян формировать длинные корешки в результате холодогов прорастивания.

Как видно из данных таблицы 15, в результате отбора устойчивых к холоду гамет средняя длина корешка в опытных вариантах существенно превышала значения в контроле, что говорит о появлении в потомстве большего количества холодостойких генотипов.

Об увеличении холодоустойчивости опытных популяций по сравнению с контролем свидетельствовало также и распределение по длине корешков, сформированных в результате холодогов прорастивания (рис. 3). Максимальный эффект наблюдается тогда, когда пыльца хранится в течение 10 суток. Так, количество семян с минимальной длиной корешка в данном варианте снизилось до 6% (контроль - 77%),

в то же время 74% семян сформировали корешки длиной свыше 20 мм, которые полностью отсутствуют в контроле.

Таблица 15

Влияние хранения пыльцы гибрида F₁ Антарес × Циан при пониженной температуре на длину корешка семян ВС₁ Циан × (Антарес × Циан) при холодном проращивании

Вариант	Длина корешка, мм
Контроль	10.0±0.21
3 суток	11.1±0.22***
7 суток	12.0±0.27***
10 суток	13.6±0.46***

*** - отличия от контроля значимы при $P < 0,001$.

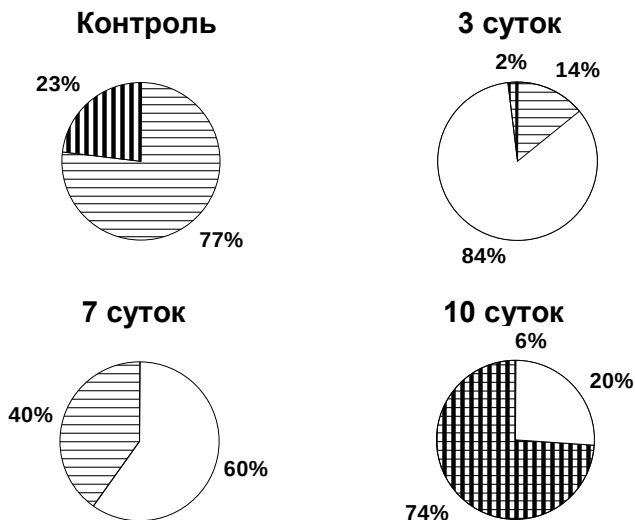


Рис. 3. Соотношение семян с различной длиной корешка, сформированного при проращивании на фоне 3°C, в контрольной и опытных популяциях ВС₁ Циан × (Антарес × Циан):

- длина корешка 1 - 10 мм;
- длина корешка 11 - 20 мм;
- длина корешка больше 20 мм.

Таким образом, приведенный пример и имеющиеся данные по другим генотипам позволяют сделать вывод, что отбор холодоустойчивых генотипов на стадии зрелого пыльцевого зерна является эффективным и может использоваться в селекционном процессе.

Отбор засухоустойчивых генотипов льна масличного на стадии зрелого пыльцевого зерна

Существование положительной корреляции между устойчивостью гаметофита и спорофита к различным стрессовым воздействиям, в том числе и к повышенной температуре, делает возможным проведение отбора генотипов по указанным признакам на стадии гамет (Кравченко и др., 1988).

На основании наших многолетних экспериментальных данных предложен способ повышения засухоустойчивости льна масличного, основанный на отборе пыльцы, устойчивой к повышенной температуре (Мищенко, Лях, 1998).

В качестве исходного материала могут использоваться межсортовые гибриды, родительские формы которых существенно отличаются по устойчивости к засухе. Сбор пыльцы проводят в утренние часы. При помощи препаровальной иглы пыльцу с пыльников вытряхивают на предметное стекло, после чего ее равномерно распределяют по поверхности стекла монослоем. Затем стекла с пылью помещают в термостат и прогревают при температуре 35°C в течение 1-2 часов. Прогревание пыльцы при более высокой температуре нежелательно, так как у  при 45°C в течение короткого времени пыльца полностью теряет  жизнеспособность. После прогревания пыльцу используют для  ения.

Предлагаемый способ позволяет значительно повышать засухоустойчивость расщепляющихся популяций спорофитов, увеличивая в несколько раз в них по сравнению с обычным опылением свежесобранной пылью количество толерантных к засухе генотипов.

Для оценки эффективности отбора на стадии зрелого пыльцевого зерна определяют процент завязываемости коробочек и семян. Кроме того, используют косвенный метод определения засухоустойчивости путем проращивания семян на растворе с осмотиком, имитирующим недостаток влаги.

Пример: на гибридах F_1 K7487 $\times$ K7734 и K7734 $\times$ K7487 был проведен микрогаметофитный отбор по вышеописанной методике, после чего пыльцу наносили на рыльца одного из родительских компонентов данного гибрида. О наличии отбора судили по завязываемости семян и коробочек в сравнении с опылением свежесобранной пылью. Эффективность отбора определяли путем проращивания семян ВС₁ контрольных и опытных вариантов на среде с осмотиком.

В результате опыления прогретой пылью завязываемость коробочек и семян существенно (почти в 2-3 раза) уменьшалась. Даже в случае 1-часового прогревания пыльцы эти показатели были значительно меньшими, чем в контроле.

Как видно из данных таблицы 16, прогревание пыльцы гибридных растений влияло как на процент прорастания семян, так и на длину корешка, сформированного на среде с осмотиком. На существенное увеличение в опытных популяциях количества засухоустойчивых генотипов указывают и показатели дисперсии. При этом максимальные отличия от контроля наблюдаются в том случае, когда пыльца прогревалась в течение 120 минут.

Таблица 16

Влияние температурной обработки пыльцы в F_1 на длину корешка семян и их прорастание на среде с осмотиком в BC_1

Вариант	Прорастание семян, %	Длина корешка	
		среднее, мм	дисперсия
<i>K7487 × (K7487 × K7734)</i>			
Контроль	5.0±2.18	1.8±0.40	0.8
60 мин	19.7±3.39***	1.7±0.17	3.2**
120 мин	34.7±2.57***	2.8±0.28**	9.8**
<i>K7487 × (K7734 × K7487)</i>			
Контроль	5.0±2.18	1.2±0.20	0.2
60 мин	17.9±3.18***	1.9±0.25	3.2**
120 мин	24.2±3.91***	5.7±1.24**	8.2**

, * - отличия от контроля значимы при $P < 0,01$ и $0,001$ соответственно.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что отбор в F_1 пыльцы, устойчивой к повышенной температуре, позволяет существенно увеличить процент засухоустойчивых генотипов в образующихся популяциях спорофитов.

Отбор засухоустойчивых генотипов клещевины на стадии зрелого пыльцевого зерна

В условиях длительности действия повышенных температур и недостаточности влагообеспечения, характерных для юга Украины, клещевина часто снижает свою потенциальную продуктивность. Вышесказанное делает актуальным создание засухоустойчивых сортов этой культуры. Установленные нами существенные различия между генотипами клещевины по чувствительности к повышенным температурам на стадии зрелого пыльцевого зерна и обнаруженная положительная зависимость между устойчивостью к повышенной температуре микрогаметофитов и засухоустойчивостью спорофита (см. раздел “Методы оценки свойств спорофита по пыльце”) обеспечивают возможность отбора засухоустойчивых генотипов на микрогаметофитном уровне.

Отбор устойчивых к засухе генотипов в мужском гаметофитном поколении проводят на стадии зрелого пыльцевого зерна. В качестве материала используют гибридный материал, полученный от скрещивания родителей с различной устойчивостью к засухе, что обеспечивает необходимую для отбора генетическую гетерогенность материала. Свежесобранную пыльцу, размещенную монослоем на предметном стекле, выдерживают 1-3 часа при температуре 40°C, после чего используют для опыления. Воздействие повышенной температуры приводит к элиминации неустойчивых к данному фактору пыльцевых зерен, что вызывает изменения в структуре расщепляющихся популяций спорофитов (Miroshnichenko, Lyakh, 1996).

Учитывая различную степень сцепления между генами в хромосомах, отбор генов, ответственных за устойчивость к повышенным температурам, может приводить не только к повышению в потомстве растений частоты засухоустойчивых генотипов, но и вызывать определенные изменения в структуре популяции по различным морфологическим признакам спорофита. Полученные нами данные свидетельствуют, что селекция устойчивой к повышенной температуре пыльцы в большинстве генных комбинаций вызывает значительные сдвиги в структуре популяции потомков гибридов по ряду признаков вегетативной и генеративной сферы растения. Однако наибольшая степень сцепления, вероятно, наблюдается между генами, детерминирующими устойчивость микрогаметофита к повышенной температуре, и генами, ответственными за развитие антоциановой окраски стебля, что позволяет использовать последний признак в качестве маркера для оценки засухоустойчивости генотипа.

Пример: свежесобранную пыльцу гибридов F_1 K497 $\times$ K1181 и K1181 $\times$ Хортицкая 1, полученных от скрещивания линий, контрастных по засухоустойчивости на уровне спорофита и контрастных по теплоустойчивости пыльцы, размещали монослоем на предметном стекле и прогревали при температуре 40°C в течение 3-х часов. Помимо вышеуказанных признаков родительские компоненты гибридов отличались также окраской стебля. В нашем примере засухоустойчивые формы K497 и Хортицкая 1 несли антоциановую окраску стебля, а у незасухоустойчивых K161 и K1181 она отсутствовала. После термообработки пыльцу использовали для самоопыления гибридов. В контроле опыление проводили свежесобранной пыльцой (табл.17).

Таблица 17

Влияние прогревания пыльцы в F_1 на соотношение растений в популяциях F_2 по окраске стебля, %

Вариант	Окраска стебля	
	с антоцианом	без антоциана
<i>K497 × K1181</i>		
Контроль	78.9	21.1
Прогревание	93.5	6.5**
<i>K1181 × Хортицкая1</i>		
Контроль	74.1	25.9
Прогревание	87.5	12.5*

*, ** - отличия от контроля значимы при $P < 0,05$ и $0,01$ соответственно.

Как видно из таблицы 17, прогревание гетерогенной популяции пыльцевых зерен указанных гибридов вызывает существенное увеличение в их потомстве доли особей с признаком антоциановой окраски стебля, характерной в данном случае для устойчивых к засухе генотипов, что косвенно свидетельствует о повышении засухоустойчивости расщепляющейся популяции спорофитов.

Изменение структуры популяции спорофитов у подсолнечника после прогревания пыльцы

Изучение генетики микрогаметофита позволяет говорить о том, что значительная часть генов генома покрытосеменных растений экспрессируется как на диплоидной, так и на гаплоидной стадиях жизненного цикла. В связи с этим, отбор в мужском гаметофитном поколении (пыльцевая селекция) рассматривается как один из эффективных методов селекции, способных в короткое время вызвать существенные изменения в структуре популяций спорофитов (Ottaviano, Mulcahy, 1989). При этом генетический состав популяции может быть изменен не только по признаку, проявляющемуся как в спорофите, так и в гаметофите, но и по свойствам, которые непосредственно не обнаруживаются в мужском гаметофитном поколении. Последнее представляется возможным вследствие тесного сцепления генов, детерминирующих оба

типа признаков.

Нами разработан способ изменения генетической структуры популяции подсолнечника по ряду агрономически-важных признаков. Он основан на прогревании гетерогенных по чувствительности к повышенной температуре популяций пыльцевых зерен при температуре 60°C в течение 3-х часов и более. В результате такой обработки в расщепляющихся популяциях спорофитов существенно изменяется частота генотипов по признакам высота растения, продолжительность периода “всходы-цветение”, количество боковых побегов и др. (Lyakh, Gasenko, Soroka, 1998).

Пример: в качестве материала использовали межвидовые гибриды F₁: *H. annuus* сорт Лидер × *H. argophyllus* и *H. annuus* сорт Юбилейный × *H. bolanderi*. Предположительно, родительские компоненты гибридов различались по засухоустойчивости. Кроме того, они отличались также по ряду количественных признаков. Растения сортов имели высоту 200–220 см, период “всходы – цветение” в среднем 60 суток, боковых побегов не образовывали. Растения - “дикари” были менее высокорослыми (при выращивании в теплице их высота в среднем составила 100–150 см), зацветали на 10–15 суток раньше сортов и имели большое количество боковых побегов.

Для проведения отбора в F₁ дозированные порции (0,5 см³) свежесобранной пыльцы помещали в пергаментные пакетики и прогревали в термостате при температуре 40°C в течение 3-х часов и 60°C в течение 1-го и 3-х часов, после чего использовали для опыления материнских компонентов скрещивания. В контроле опыление проводили свежесобранной пыльцой. Полученные семена высевали в поле. Влияние различных обработок пыльцы гибридов F₁ на структуру расщепляющихся популяций спорофитов ВС₁ оценивали по изменению высоты растений, продолжительности периода “всходы – цветение”, а также по наличию и количеству боковых побегов на растении, исходя из того, что родительские формы были контрастными по данным признакам.

Таблица 18

Влияние различных режимов прогревания пыльцы в F_1 на распределение растений в популяциях BC_1 по некоторым агрономически - важным признакам, %

Вариант	Высота, см		Всходы-цветение		Боковые побеги	
	до 200	> 200	до 55 сут	> 55 сут	есть	нет
<i>BC_1 Юбилейный × (Юбилейный × H.bolanderi)</i>						
Контроль	75.8	24.2	59.1	40.9	77.4	22.6
40°C, 3ч	70.8	29.2	61.5	38.5	72.3	27.7
60°C, 1ч	71.6	28.4	51.7*	48.3*	72.9	27.1
60°C, 3ч	53.5**	46.5**	25.6***	74.4***	32.6***	67.4***
<i>BC_1 Лидер × (Лидер × H.argophyllus)</i>						
Контроль	74.3	25.7	58.6	41.4	28.6	71.4
60°C, 3ч	52.8*	47.2*	44.4*	55.6*	19.4	80.6

*, **, *** - отличия от контроля значимы при $P < 0,05, 0,01$ и $0,001$ соответственно.

Результаты, приведенные в таблице 18, показывают, что наибольшее влияние на структуру расщепляющихся популяций BC_1 оказывало прогревание пыльцы растений F_1 на температурном фоне 60°C в течение 3-х часов. Как видно, в опытных вариантах увеличивалась частота высокорослых растений типа культурных сортов и, соответственно, уменьшалась частота растений "дикого" типа.

Рисунок 4 также демонстрирует эффективность действия отбора, который вызывал элиминацию крайних по высоте растений форм, но в целом приводил к повышению частоты более высокорослых растений.

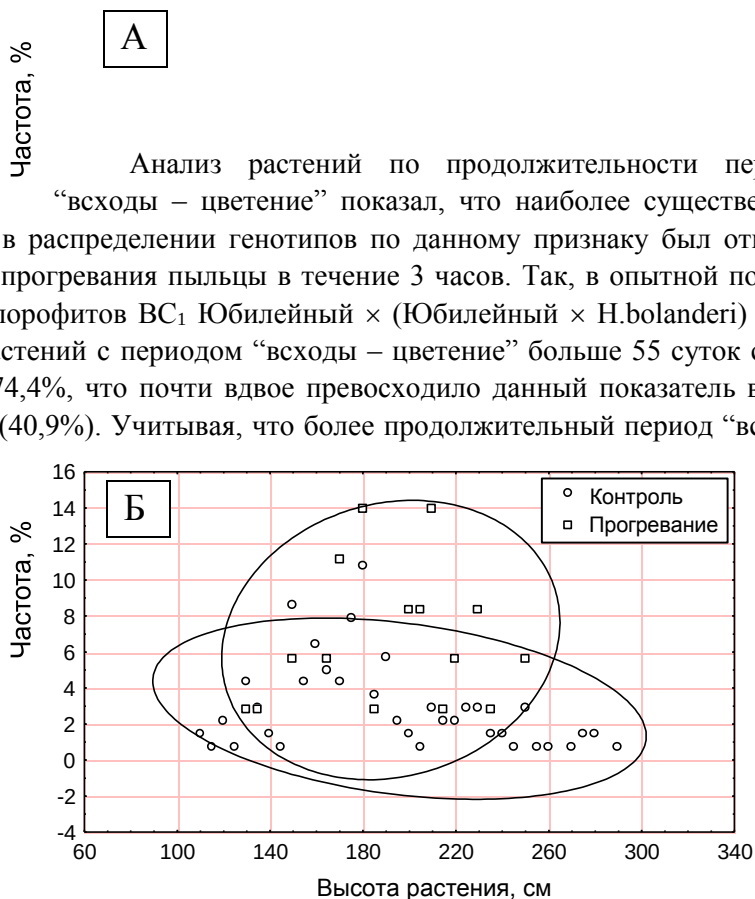


Рис. 4. Влияние прогревания пыльцы (60°C, 3 часа) в F₁ на распределение растений по высоте в популяциях BC₁. А - BC₁ Юбилейный × (Юбилейный × *H. bolanderi*), Б - BC₁ Лидер × (Лидер × *H. argophyllus*).

– цветение” характерен для культурных сортов, использовавшихся в скрещиваниях, можно говорить о том, что и по данному признаку в опытных популяциях ВС₁ увеличивался процент растений "культурного" типа. В популяциях ВС₁, полученных от опыления прогретой при температуре 60°C в течение 3-х часов пылью, значительно снизилось и среднее количество побегов на растении (табл. 18).

Обобщая полученные данные, можно сказать, что термообработка пыльцы при 40°C (3 часа) и 60°C (1 час) практически не вызвала селективной элиминации генотипов в популяциях микрогаметофитов изученных гибридов. Более жесткий температурный фон (60°C, 3 часа) оказывал значительное селективное давление, вызывая при этом гибель пыльцевых зерен преимущественно "дикого" типа, о чем свидетельствовало значительное увеличение в опытных популяциях спорофитов растений с признаками культурных сортов.

Отбор ранозацветающих генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного

Полагают, что отбор интересующих селекционера генотипов в период роста пыльцевых трубок, по сравнению с другими фазами функционирования мужского гаметофита, может быть наиболее реальным, поскольку известно, что по скорости роста пыльцевых трубок существует значительная генетическая изменчивость. В настоящее время устойчивая связь между скоростью роста пыльцевых трубок и определенными признаками спорофита уже выявлена на ряде культур. При этом показано, что быстрорастущие пыльцевые трубки способствуют образованию потомства с более ранним развитием (Winson et al., 1987).

В основе предлагаемого нами способа отбора ранозацветающих генотипов льна масличного лежит создание таких условий, когда в оплодотворении принимают участие лишь наиболее быстрорастущие пыльцевые трубки. У льна это достигается удалением примерно половины пестика через 40 мин после опыления при температуре в период роста пыльцевых трубок в тканях столбика 20-25°C (Мищенко, Лях, 1998).

Пример: в качестве материала использован гибрид F₁ Циан × Антарес, родительские формы которого различались между собой продолжительностью периода “всходы-цветение” (сорт Антарес зацветал на 8 дней раньше сорта Циан). Растения F₁ выращивались в условиях фитотрона при температуре 18°C в течение 8 часов (ночь) и 26°C в течение 16 часов (день). Бутоны кастрировались во второй половине дня на стадии окрашенного конуса венчика путем удаления 5-ти тычинок с оставлением венчика и последующей изоляцией. Опыление проводили в утренние часы свежесобранной пылью. Пыльца наносилась на верхнюю часть рыльца. В опытных вариантах часть пестика (примерно половина) удалялась через определенную продолжительность периода после опыления: 40, 60 и 120 минут; контроль - без удаления. Полученные семена высевали в теплицу в грунт. О структуре популяций F₂ судили по соотношению растений с различной продолжительностью периода “всходы-цветение”.

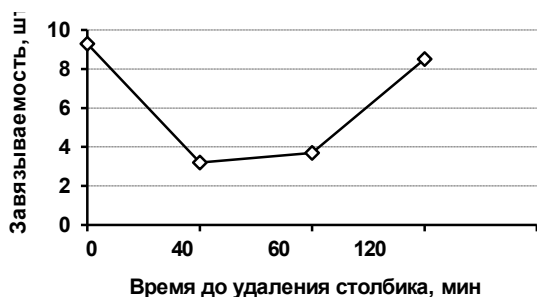


Рис. 5. Завязываемость семян льна в зависимости от продолжительности периода между опылением и удалением части пестика у гибрида F₁ Циан × Антарес.

Полученные данные о завязываемости семян, представленные на рисунке 5, где представлены данные о завязываемости семян. При этом в первом случае (40 мин) оплодотворение яйцеклеток обеспечивается лишь быстрорастущими пыльцевыми трубками, тогда как во втором (120 мин) - в оплодотворении участвует практически тот же набор микрогаметофитов, что и в варианте без удаления части пестика.

Анализ расщепляющихся популяций F₂ показал, что между самими вариантами с различной продолжительностью периода от опыления до удаления части пестика и между ними и контролем имеются существенные различия в распределении растений по периоду “всходы-цветение” (табл. 19). При этом наибольшая частота генотипов с коротким периодом “всходы-цветение” отмечена в варианте с

Изменение продолжительности периода между опылением и удалением части пестика с 40 мин до 120 мин существенно влияет на количество пыльцевых трубок, достигающих до завязи, что можно видеть на рисунке 5, где представлены данные о завязываемости семян. При этом в первом случае (40 мин) оплодотворение яйцеклеток обеспечивается лишь быстрорастущими пыльцевыми трубками, тогда как во втором (120 мин) - в оплодотворении участвует практически тот же набор микрогаметофитов, что и в варианте без удаления части пестика.

наименьшей продолжительностью периода между размещением пыльцы на рыльце и удалением половины пестика. Так, если в контроле было 28,3% ранозацветающих растений, то в опыте, где часть пестика удаляли через 40 минут после опыления, частота растений, зацветших до 45 дней после всходов, увеличилась почти вдвое и составила 55,5%. Увеличение продолжительности периода от опыления до удаления части пестика приводило к уменьшению частоты цветущих в ранние сроки генотипов и при удалении половины пестика через 120 мин после опыления частота растений с коротким периодом “всходы-цветение” в популяциях F₂ максимально приближалась к значениям контрольного варианта.

Таблица 19

Соотношение растений с различным периодом “всходы-цветение” в популяциях F₂ в зависимости от продолжительности периода между опылением и удалением части пестика у гибрида F₁ Циан × Антарес, %

Время до удаления пестика, мин	Период “всходы-цветение”, дни		
	до 45	46-55	56 и более
Без удаления (контроль)	28.3±3.94	56.6±3.06	15.1±4.28
40	55.5±4.72***	44.5±5.27*	0***
60	44.1±5.02*	51.0±4.68	4.8±6.45
120	38.7±2.53*	57.3±2.11	4.0±3.14

*, *** - отличия от контроля значимы при P< 0,05 и 0,001 соответственно.

В ряде работ по селекции льна масличного на скороспелость показана эффективность использования в скрещиваниях форм с коротким периодом “всходы-цветение”. В силу этого, методический прием, основанный на существовании положительной связи между скоростью роста пыльцевых трубок и коротким периодом “всходы-цветение”, что позволяет вести целенаправленный отбор ранозацветающих генотипов в мужском гаметофитном поколении, может быть полезен и применим на практике.

Отбор скороспелых генотипов клещевины в мужском гаметофитном поколении

Климатические условия умеренной зоны, прежде всего низкие температуры весны и осени, ограничивают период вегетации клещевины, склонной к непрерывному росту. Этим определяется перспективность работ по выявлению скороспелых генотипов данной культуры.

Различные линии клещевины обнаруживают существенные отличия по продолжительности основных периодов вегетации, что позволяет разделить их на группы спелости: ранне-, средне- и позднеспелые. При этом пыльца растений различных групп отличается по своей конкурентоспособности: у скороспелых форм темп роста пыльцевых трубок выше, чем у позднеспелых (коэффициент корреляции составляет 0,59-0,71). Поэтому, создавая условия для осуществления интенсивной конкуренции генетически разнокачественной пыльцы гибридов F_1 , полученных от скрещивания контрастных по этому признаку форм, можно добиться избирательного оплодотворения более конкурентоспособной, т.е. быстрорастущей пыльцой. Следствием этого будет наблюдаться изменение качества образующегося спорофитного поколения.

Различия в интенсивности отбора по конкурентной способности пыльцы благодаря удлинённой поверхности рыльца у клещевины обеспечиваются за счёт нанесения избыточного количества пыльцевых зёрен на разные его части: на ближнюю к завязи часть рыльца и на максимально удалённые от завязи концы рылец. Разница в расстоянии между проксимальным и дистальным размещением пыльцы составляет 8-15 мм в зависимости от генотипа и является достаточной для обеспечения более интенсивной конкуренции между мужскими гаметофитами, чем этого можно было бы достичь при обычном опылении.

Используя этот подход, нами разработан методический приём манипулирования мужским гаметофитным поколением, обеспечивающий насыщение популяции спорофитов скороспелыми генотипами. С этой целью при опылении гибридов пыльцу наносят на максимально удалённую от завязи часть рыльца. Это позволяет участвовать в оплодотворении лишь наиболее конкурентоспособным мужским гаплоидным генотипам, что в дальнейшем приводит к увеличению частоты скороспелых генотипов в расщепляющихся популяциях спорофитов (Мирошниченко, Лях, 1999).

Пример: в качестве материала использовали гибриды F_1 , полученные от скрещивания контрастных по скороспелости линий клеще-

вины - К 1181 (скороспелая) × К 1182 (позднеспелая), Semu (скороспелая) × К 415 (позднеспелая), Semu × К 1182. Отбор наиболее конкурентоспособных микрогаметофитов благодаря удлиненной поверхности рыльца у клещевины обеспечивали за счет нанесения пыльцевых зерен на максимально удаленные от завязи концы рылец (дистальное размещение пыльцы). Сравнение проводили с вариантом, где пыльцу наносили на ближнюю от завязи часть рыльца. Очевидно, что при дистальном размещении пыльцы на рыльце по сравнению с проксимальным имеется значительно большая возможность для обеспечения преимущества одних гаметофитов над другими. Поэтому в первом случае за счет более интенсивной конкуренции микрогаметофитов в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок частота наиболее конкурентоспособных гаплоидных генотипов, участвующих в оплодотворении, будет значительно больше, чем во втором. Разница в расстоянии между проксимальным (ближним к завязи) и дистальным (дальним) размещением пыльцы составляла от 8 до 15 мм в зависимости от генотипа. Для опыления в обоих случаях использовали избыточное (около 1000 пыльцевых зерен) количество свежесобранной пыльцы, нанося ее на рыльца 3-5-дневного возраста. До и после опыления женские цветки изолировали. Образовавшиеся семена высевали в поле. О структуре популяций F₂ судили по частоте растений с различным уровнем развития в период всходов и цветения соответственно через 15 и 45 дней после посева, а затем и при созревании.

Данные о структуре популяций, полученных в результате самоопыления гибридных растений F₁ при ближнем и дальнем к завязи нанесении пыльцы на рыльце и оцененных на ранних этапах вегетации растения, представлены в таблице 20. Видно, что большая интенсивность микрогаметофитной конкуренции приводила к существенному увеличению в потомстве гибридов числа растений с лучшим ранним ростом. При этом различия между вариантами хорошо видны уже в период всходов. Такой же уровень различий между вариантами сохраняется и при созревании растений.

Таблица 20

Прохождение некоторых этапов вегетации растениями популяций F₂ при различной интенсивности микрогаметофитного отбора в F₁

Размещение пыльцы на рыльце	Частота растений, %			
	Всходы		Цветение	
	отсутствие всходов - желтые семядоли	зеленые семядоли - настоящие листья	отсут- ствие цветения	цветение центральной кисти и кисти 1-го порядка
<i>K1181 × K1182</i>				
Проксимальное [@]	34.6	65.4	60.0	40.0
Дистальное [@]	22.0	78.0*	44.0	56.0**
<i>Semu × K415</i>				
Проксимальное	21.0	79.0	39.3	60.7
Дистальное	13.4	86.6	23.3	76.7**
<i>Semu × K1182</i>				
Проксимальное	22.1	77.9	38.5	61.5
Дистальное	8.6	91.4**	35.2	64.8

*, ** - отличия от контроля значимы при $P < 0,05$ и $0,01$ соответственно.

[@] - проксимальное размещение пыльцы - ближе к завязи, дистальное - дальше от завязи.

Полученные данные позволяют сделать вывод о существовании довольно тесной связи между конкурентоспособностью пыльцы и скороспелостью спорофита. Вероятно, что микрогаметофиты, несущие гены, детерминирующие раннее созревание, являются более конкурентоспособными. Поэтому высокая интенсивность гаметофитной конкуренции обеспечивает увеличение количества растений с лучшим ранним ростом и более скороспелых.

Отбор ранозацветающих генотипов в мужском гаметофитном поколении у рапса ярового

В связи с продвижением рапса в новые зоны возделывания возрастает необходимость создания его скороспелых и ультраскороспелых сортов. Особенно это актуально для яровых форм. Например, более скороспелые сорта и гибриды способны обеспечить большую стабильность урожая в подверженных засухе районах за счет ускоренного созревания и ухода от засухи. Одним из приемов, способным изменить структуру расщепляющейся популяции, образующейся после опыления гетерогенной пылью, является метод микрогаметофитного отбора. Он основан на том, что быстрый рост пыльцевых трубок у рапса ярового и высокая их конкурентоспособность негативно коррелированы с ранним цветением (Лях, Сорока, 1998). В случае практического применения это означает, что для реализации в потомстве большего количества ранозацветающих растений необходимо в процессе опыления-оплодотворения исключить конкуренцию между пыльцевыми зернами. Это достигается тем, что под изолятором на рыльце кастрированного за день до распускания цветка кончиком препаровальной иглы или другим подходящим инструментом наносится ограниченное (5-50) количество пыльцевых зерен (табл.21). Для обеспечения большей генетической гетерогенности пыльцу лучше брать с гибридных растений.

Таблица 21

Сравнение результатов опыления гибридов F_1 рапса ярового при избыточном и ограниченном опылении

Вариант	Растения F ₁		Популяция растений F ₂	
	Длина стручка, см.	Кол-во семян, шт.	Растения, цветущие в ранние сроки, %	
			45 дней [@]	50 дней [@]
Гибрид F ₁ UKR 87				
Избыточное опыление	5.1	20.8	1.9	18.6
Ограниченное опыление	3.0***	6.2***	8.8***	43.7***
Гибрид F ₁ UKR 67				
Избыточное опыление	4.7	18.0	1.8	19.1
Ограниченное опыление	2.7***	5.5***	14.7***	44.7***

*** - отличия от контроля значимы при $P < 0,001$;

@ - длительность периода "всходы - цветение".

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 ранозацветающих растений, чем в случае стандартного опыления, когда на рыльца наносится избыточное количество пыльцевых зерен. Так, из таблицы 21 видно, что для двух приведенных в качестве примера гибридов ярового рапса вышеописанный прием ограниченного опыления обеспечил, что в их потомстве было в два раза больше растений, которые цвели на 50-й день после всходов.

ЛИТЕРАТУРА

Гасенко Н.В., Лях В.А. Отбор холодоустойчивых генотипов на стадии зрелой пыльцы у подсолнечника / Збірник наук. праць. - Запоріжжя, 1997. - С.1-4.

Дорофеев В.Ф., Лаптев Ю.П., Чекалин Н.М. Цветение, опыление и гибридизация растений. - М.: Агропромиздат, 1990. - 73с.

Калинова М.Г. Мікрогаметофітний добір на холодостійкість у ріпака ярого: Дис. ... канд. с.-г. наук. - Запоріжжя, 1999. - 148с.

Калинова М.Г., Сорока А.И., Лях В.А. Связь между холодоустойчивостью гаметофита и спорофита у рапса ярового / Збірник наук. праць. - Запоріжжя, 1997. - С.10-14.

Калинова М.Г., Сорока А.И., Лях В.А. Влияние отбора в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых гибридов F₁ на холодоустойчивость потомства у ярового рапса // Цитология и генетика. - 1998. - N5. - С.41-47.

Кравченко А.Н., Лях В.А., Тодераш Л.Г. и др. Методы гаметной и зиготной селекции томатов. - Кишинев: Штиинца, 1988. - 152с.

Лях В.А., Калинова М.Г., Сорока А.И. Микрогаметофитный отбор на устойчивость к пониженной температуре у рапса ярового // Цитология и генетика. - 1997. - N3. - С.71-76.

Лях В.А., Сорока А.И. Отбор скороспелых генотипов ярового рапса на микрогаметофитном уровне // Сельхоз. биол. - 1998. - N3. - С.40-43.

Лях В.А., Сорока А.И. Эффективность микрогаметофитного отбора на устойчивость кукурузы к температурному фактору // Сельхоз. биол. - 1993. - N3. - С.38-44.

Лях В.А., Шегда В.Н. Жирнокислотный состав пыльцы у линий подсолнечника с разным содержанием в семенах олеиновой кислоты // Селекция и семеноводство. - 1998. - N3. - С.7-8.

Мирошниченко Е.Н., Лях В.А. Изменение структуры популяций F₂ в зависимости от интенсивности микрогаметофитной конкуренции в F₁ у *Ricinus communis* L. // Цитология и генетика. - 1999. - N3. - С.73-77.

Мищенко Л.Ю., Лях В.А. Влияние хранения пыльцы *Linum usitatissimum* на ее качество / Збірник наук. праць. - Запоріжжя, 1997. - С.38-41.

Мищенко Л.Ю., Лях В.А. Влияние отбора по конкурентоспособности пыльцы на соотношение по скороспелости потомства гибридов льна масличного // Цитология и генетика. - 1998. - N4. - С.31-36.

Мищенко Л.Ю., Лях В.А. Отбор засухоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного // Вісник аграрної науки. - 1998. - N9. - С.41-44.

Мищенко Л.Ю., Сорока А.И., Лях В.А. Селекция холодоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного / Збірник наук. праць. - Запоріжжя, 1998. - С.34-38.

Поддубная-Арнольди В.А. Цитозембриология покритосемянных растений. - М., 1976. - 507с.

Hodgkin T., Marr A., Wiseman E. "In vitro" germination of *Brassica oleracea* pollen // *Cruciferae Newsletter*, 1982. 7: 43-44.

Hormaza J.I., Herrero M. Pollen selection // *Theor. Appl Genet.*, 1992. 83: 663-672.

Jourdren C., Simonneaux D., Renard M. Selection on pollen for linolenic acid content in rapeseed, *Brassica napus* L. // *Plant breeding*, 1996. 115: 11-15.

Keshava Murthy M.N., Nanja Reddy Y.A., Virupakshappa K. Development of suitable germination medium for trinucleate pollen grains: an illustration with sunflower // *J.Oilseeds Res.*, 1994. 11(2): 304-307.

Lyakh V., Gasenko N., Soroka A. Unfluence of pollen heating on the quality of resulting sporophyte generation in sunflower // *Helia*, 1998. 21(29): 103-108.

Lyakh V., Soroka A., Kalinova M. Pollen storage at low temperature as a procedure for the improvement of cold tolerance in spring rape, *Brassica napus* L. // *Plant breeding*, 1998. 117(4): 389-391.

Miroshnichenko E., Lyakh V. Selection of drought-tolerant genotypes at the stage of mature pollen grain in castorbean. *Proc. EUCARPIA Symp. Breeding Oil and Protein Crops. Zaporozhye, Ukraine*, 1996. P.140-143.

Ottaviano E., Mulcahy D.L. Genetics of angiosperm pollen // *Advances in genetics*, 1989. 26: 1-64.

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.

Roberts I.N., Gaude T.C., Harrod G., Dickinson H.G. Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*: a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self incompatibility // *Theor.Appl.Genet.*, 1983. 65(3): 231-238.

Soroka A.I. Germination media for rapeseed and castorbean pollen. *Proc. EUCARPIA Symp. Breeding Oil and Protein Crops. Zaporozhye, Ukraine*, 1996. P.289-292.

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. 5: 643-656.

Авторы:

Лях Виктор Алексеевич, докт. биол. наук
Сорока Анатолий Иванович, канд. биол. наук
Мищенко Людмила Юрьевна, канд. с.-х. наук
Калинова Мария Григорьевна, науч.сотр.
Мирошниченко Елена Николаевна, аспирант

**Методы отбора ценных генотипов на уровне
пыльцы**

(Методические рекомендации)

Редакторы: В.А.Лях, А.И.Сорока, Л.П.Подус
Компьютерная верстка: А.И.Сорока
Рис. на обложке художника С.И.Билименко

Сдано в набор 10.01.2000
Формат 60 × 84 1/16

Подп. к печати 31.01.2000
Уч-изд. л. 3

Тираж 100 экз.

Институт масличных культур УААН,
70417, Запорожье, ул.Весенняя, 1

Экспресс-типография “Этга-пресс”
Запорожье, пр.Ленина, 105