

А.В. Кильчевский, член-корреспондент ААН РБ, доктор биологических наук, профессор
И.Г. Пугачева, аспирантка

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия
УДК 631.527:635.64

Гаметная селекция томата на холодоустойчивость

Изучена корреляционная зависимость между признаками спорофита и микрогаметофита томата. Тесные связи ($r = 0,726-0,965$) обнаружены между параметрами холодоустойчивости пыльцы, проростков и взрослых растений в группе раннеспелых образцов. Вероятной причиной этого является сопряженность холодоустойчивости и скороспелости томата. Проанализировано влияние температуры и длительности холодостресса на процент прорастания пыльцы, длину пыльцевой трубки на искусственной питательной среде, а также на завязываемость плодов и их осемененность при опылении в естественных условиях. На основании этого выделены два режима холодной обработки пыльцы, которые позволяют отобрать около 30% наиболее холодоустойчивых пыльцевых зерен. Эффективность однократного пыльцевого отбора в F_1 по холодоустойчивости маскируется модифицирующим действием низких температур на развитие семян. Положительный эффект гаметной селекции проявляется в F_2 , что выражается в увеличении скорости и конечного процента прорастания семян при низкой температуре. Применение комбинированного отбора (по гаметофиту в F_1 и по проросткам в F_2) более эффективно по сравнению с отбором по гаметофиту в селекции на холодоустойчивость.

Традиционная селекция на уровне спорофита не всегда позволяет достаточно быстро и эффективно получать формы растений с заданными свойствами. Применение методов гаметной и зиготной селекции значительно ускоряет селекционный процесс благодаря возможности заменить естественную неуправляемую элиминацию рекомбинантных гамет и зигот искусственно регулируемым отбором. К настоящему времени накоплены данные о корреляции между устойчивостью гаметофита и спорофита к абиотическим и биотическим факторам, что указывает на возможность отбора генотипов по этим признакам на стадии гамет. За счет гаметной и зиготной селекции удается отбирать спорофиты, характеризующиеся высокой устойчивостью репродуктивных органов к стрессовым воздействиям [3].

В задачу наших исследований входило изучение корреляционных связей между характеристиками спорофита и гаметофита томата, разработка метода отбора устойчивой к низким температурам пыльцы, проверка его эффективности по изменению холодоустойчивости спорофитных поколений F_2 и F_3 .

Материал и методы исследований

Эксперименты проводились на опытном поле и в лаборатории кафедры сельскохозяйственной биотехнологии

The article studies the correlation dependence between tomato sporophyte and gametophyte characteristics. There are close correlations ($r = 0,726-0,965$) between pollen, seedlings and mature plants cold resistance parameters among early ripening varieties. The probable reason may be the fact that tomato cold resistance attended by short ripening period. The article analyses cold stress temperature and durability influence on pollen viability; pollen tube length on artificial nutrient media; on fruit setting and average seeds amount per fruit during pollination in real conditions. On this basis two low temperature treatment regimes were chosen as well as they allowed to pick out 30% of the most resistant pollen grains. The positive effect of one time F_1 pollen selection on sporophyte cold resistance is hidden by low temperature modification influence on seeds development. Male gametophyte selection effects positively on the F_2 sporophyte cold resistance because the rapid and the final percentage of seeds germination under the low temperature conditions are higher. Using the combined selection (in pollen F_1 then in seedlings F_2) is more efficient in cold resistance breeding than in pollen F_1 only.

и экологии БГСХА в 1998-2000 гг. Материалом для исследований послужили 23 образца томата, имеющие различное эколого-географическое происхождение. В опытах определяли следующие характеристики спорофита: всхожесть семян (%), массу (мг) и длину корня и стебля (см) проростков при прорастании в оптимальных (25 °С) и стрессовых (10-12 °С) условиях в течение 15 дней, индексы холодоустойчивости $^{1/1}$ (отношение значения признака на стрессовом фоне II к значению на оптимальном фоне I); основные параметры продуктивности растений (ц/га). Характеристики гаметофита – уровень прорастания пыльцы (%) и длину пыльцевой трубки (в делениях шкалы окуляра-микрометра) – определяли при 25 °С и 10-12 °С, используя методики И.Н. Голубинского (1974), А.Н. Кравченко и др. (1990).

Разработка методики отбора устойчивой к холоду пыльцы предполагала изучение влияния температуры и экспозиции низкотемпературной обработки на пыльцу при проращивании на искусственных питательных средах и при опылении в естественных условиях. В экспериментах использовали бытовой холодильник с температурой +1 °С и -12 °С (морозильная камера). Для исследований брали пыльцу сорта Доходный и партенокарпической Линин-7. На основе питательной среды (20% сахарозы и 0,006% борной кислоты) с добавлением пыльцы была приготовлена суспензия, которую на 30 минут помещали в

оптимальные условия для инициации прорастания пыльцы.

На первом этапе после такой подготовки материал подвергали двум вариантам холодной обработки (+1 °С и -12 °С) в течение 0,5; 1, 2, 3, 4, 5 часов. После этого порцию суспензии помещали в каплю питательной среды при температуре 28 °С на 3 часа. Процент прорастания пыльцы определяли при помощи микроскопа Биолам (увеличение 7x20). Длину пыльцевой трубки вычисляли как среднее по 20 измерениям в каждом поле зрения. В вариантах анализировали около 500 пыльцевых зерен в 5 полях зрения.

На втором этапе изучали оплодотворяющую способность (завязываемость плодов, процент осемененных плодов от числа завязавшихся, среднее число семян в плоде) пыльцы, перенесшей стрессовое воздействие различной интенсивности и продолжительности.

Для анализа эффективности предложенных методов отбора использовали три гибридные комбинации между сортами белорусской, молдавской и польской селекции, обладающими ценными свойствами и отличающимися по устойчивости к низким температурам на основании проведенной нами оценки. Растения F₁ (Талалихин x Povarek F₁, Leana x Талалихин F₁, Доходный x Povarek F₁) были самоопылены по следующей схеме: К – опыление суспензией «пыльца + питательная среда» (20% сахарозы + 0,006% борной кислоты) без холодной обработки; режим 1 – суспензия выдержана 1 час при -12 °С; режим 2 – суспензия выдержана 3 часа при +1 °С. Перед стрессовым воздействием суспензия помещалась в оптимальные условия (28 °С на 30 минут) для инициации прорастания пыльцы. Полученные семена F₂ проращивали при 10-12 °С, проростки разделяли на группы (холодостойкие и нехолодостойкие) по комплексу признаков. В фазу цветения устойчивые растения повторно опылили обработанной холодной пыльцой. Семена F₂ и F₃ (4 повторности по 50 штук) проращивали при 10-12 °С в течение 16 суток. Изучали динамику прорастания семян (число дней до начала прорастания, число дней до появления 50% проростков, полный процент прорастания). Для статистической обработки результатов экспериментов применяли методы дисперсионного и корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

Изучение коэффициентов корреляции между признаками спорофита и гаметофита всех изучаемых образцов не выявило тесной связи между ними. Параметры пыльцы и растений находятся в средней ($r = -0,311 \dots 0,536$) или слабой ($r = -0,254 \dots 0,272$) зависимости. Принимая во внимание наличие сопряженности между скороспелостью и холодостойкостью у томата [1], мы разделили анализируемые генотипы по срокам созревания и изучили корреляционные связи в группе раннеспелых образцов (табл. 1).

Наблюдается сильная связь между массой проростка в оптимальных условиях, с одной стороны, уровнем прорастания пыльцы при 10-12 °С ($r = 0,726$), длиной пыльцевой трубки при 25 °С ($r = -0,801$) и параметром холодостойкости по длине пыльцевой трубки ($r = 0,822$), с другой. Масса проростка в стрессовых условиях имеет тесную прямую связь с уровнем прорастания пыльцы при низкой положительной температуре и ее холодостойкостью ($r = 0,913$, $r = 0,763$). Между холодостойкостью по длине пыльцевой трубки и массой проростка при низкой температуре существует тесная прямая зависимость ($r = 0,965$). Таким же образом связаны параметры холодостойкости по проценту прорастания пыльцы и массе проростка ($r = 0,734$).

Признаки гаметофита: 1. Процент прорастания пыльцы при 25 °С; 2. Средний процент прорастания пыльцы при 10-12 °С; 3. Средний показатель холодостойкости по проценту прорастания пыльцы; 4. Длина пыльцевой трубки при 25 °С; 5. Средняя длина пыльцевой трубки при 10-12 °С; 6. Средний показатель холодостойкости по длине пыльцевой трубки;

признаки спорофита: 7. Масса проростка в оптимальных условиях; 8. Масса проростка в стрессовых условиях; 9. Индекс $^{11}/_1$ по массе проростка; 10. Индекс $^{11}/_1$ по проценту прорастания семян; 11. Индекс $^{11}/_1$ по длине корня проростка; 12. Длина стебля проростка в оптимальных условиях; 13. Индекс $^{11}/_1$ по длине стебля проростка; 14. Общий урожай; 15. Товарный урожай.

Приведенные в таблице характеристики взрослых растений томата (общий и товарный урожай) довольно тес-

Таблица 1. Корреляционный анализ показателей спорофита и гаметофита раннеспелых генотипов томата (1998-2000 гг.)

Номер признака	Признаки спорофита									
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Признаки гаметофита	1	0,440	0,239	-0,302	0,563	-0,196	0,246	-0,563	0,177	0,297
	2	0,726	0,913	0,490	0,511	-0,628	0,593	-0,685	0,952	0,894
	3	0,412	0,763	0,734	0,099	-0,495	0,418	-0,279	0,839	0,694
	4	-0,801	-0,818	-0,289	-0,476	0,195	-0,524	0,538	-0,819	-0,773
	5	-0,184	0,011	0,238	-0,279	-0,441	0,178	0,014	0,070	-0,045
	6	0,822	0,965	0,459	0,490	-0,431	0,608	-0,638	0,958	0,897

но коррелируют с уровнем прорастания пыльцы при низкой температуре и холодостойкостью по этому показателю ($r = 0,694 \dots 0,952$). Тесная обратная связь признаков продуктивности выявлена с длиной пыльцевой трубки в оптимальных условиях ($r = -0,773$; $r = -0,819$), а вот показатель холодоустойчивости по длине пыльцевой трубки связан с этими же признаками спорофита тесной прямой зависимостью.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии тесных взаимодействий между проявлением различных признаков спорофита и гаметофита у скороспелых форм томата. Это подтверждает экспрессию генов томата, контролирующих устойчивость к низким температурам, на обеих стадиях жизненного цикла (гаметофит, спорофит), поэтому правомерно предположить, что отбор микрогаметофитов, устойчивых к холоду, приведет к появлению подобной устойчивости у спорофитов.

В ходе изучения влияния температуры и длительности холодового стресса на пыльцу при проращивании на искусственной питательной среде (табл.2) выявлено, что после 30 минут пребывания при $+1^\circ\text{C}$ и последующем переносе в оптимальные условия жизнеспособность пыльцы сорта Доходный снижается на 14,8%, а Линии-7 – на 25,9%. При более интенсивном холодовом стрессе (-12°C) той же продолжительности способность прорасти сохраняет около 54% пыльцевых зерен обоих образцов.

Пятичасовое воздействие температурой $+1^\circ\text{C}$ снижает процент прорастания пыльцы изучаемых генотипов приблизительно до 3%, в то время как длительная обработка при -12°C приводит к полной потере жизнеспособности пыльцы. Что касается длины пыльцевых трубок, то

увеличение времени и интенсивности низкотемпературного стресса приводит к статистически достоверному снижению этого показателя.

Исследование оплодотворяющих свойств пыльцы, перенесшей низкотемпературный стресс, показало, что завязываемость плодов у Линии-7 в сравнении с сортом Доходный была выше и практически не изменялась при увеличении длительности и интенсивности холодовой обработки пыльцы, благодаря проявлению партенокарпии. Процент осемененных плодов у сорта был на уровне 100% (при 15-30% у Линии-7) во всех вариантах опыта, что указывает на необходимость образования семян для завязывания плода у непартенокарпического образца.

Среднее число семян в плодах, полученных при использовании различных способов холодовой обработки пыльцы сорта Доходный, составляло от 14 до 50 шт., тогда как у Линии-7 – от 2 до 7. Отсюда следует, что использование партенокарпических форм в гаметной селекции на стрессоустойчивость позволит применить более жесткие режимы отбора пыльцы, поскольку образование плода у этих форм практически не зависит от числа жизнеспособных пыльцевых зерен, попавших на рыльце пестика.

Взаимное расположение графиков а, в, д на рисунке, характеризующих проростки F_2 , отражает примерно одинаковые темпы прорастания семян, полученных без холодовой обработки гаметофита (контроль), а также в вариантах с воздействием на пыльцу F_1 при помощи режимов 1 и 2, обозначенных соответственно «режим 1 (гам F_1)» и «режим 2 (гам F_1)». Таким образом, однократный гаметофитный отбор в F_1 практически не оказывает положительного влияния на повышение холодоустойчивос-

Таблица 2. Влияние температуры и длительности холодового стресса на пыльцу при проращивании на искусственной питательной среде (1999-2000 гг)

Вариант опыта	Сорт Доходный				Партенокарпическая Линия-7			
	жизнеспособность пыльцы, %	% от контроля	длина пыльцевой трубки*	% от контроля	жизнеспособность пыльцы, %	% от контроля	длина пыльцевой трубки*	% от контроля
Контроль	37,8		3,9		46,0		3,3	
$+1^\circ\text{C}$								
0,5 ч	32,2	85,2	3,5	89,7	34,1	74,1	3,3	100,0
1 ч	27,5	72,8	2,9	74,4	30,4	66,1	2,1	63,6
2 ч	19,2	50,8	2,4	61,5	24,4	53,0	2,0	60,6
3 ч	12,3	32,5	1,6	41,0	14,4	31,3	1,1	33,3
4 ч	5,5	14,6	1,0	25,6	6,5	14,1	0,8	24,2
5 ч	1,2	3,2	0,7	17,9	1,3	2,8	0,5	15,2
-12°C								
0,5 ч	20,3	53,7	2,3	59,0	24,9	54,1	2,7	81,8
1 ч	13,8	36,5	1,7	43,6	16,4	35,7	1,9	57,6
2 ч	8,9	23,5	1,2	30,8	9,6	20,9	1,5	45,5
3 ч	2,1	5,6	0,8	20,5	5,1	11,1	1,1	33,3
4 ч	0,3	0,8	0,5	12,8	0,7	1,5	0,4	12,1
5 ч	0	0	0	0	0	0	0	0
НСР ₀₅		3,33		6,33		0,45		2,01

Примечание. * – в делениях шкалы окуляра-микрометра

ти спорофитного поколения F_2 по причине модифицирующего действия низких температур. В связи с этим целесообразно было исследовать холодостойкость спорофитов томата в F_3 , где отрицательное влияние стресса было снято при создании благоприятных условий для роста растений.

Графики б, г, е на рисунке иллюстрируют динамику прорастания семян F_3 , в процессе образования которых применялись различные режимы и кратность отбора по

пыльце в сочетании с отбором по проросткам в F_2 . Модификации от действия низких температур на пыльцу F_1 в третьем поколении не проявляются, обнаруживая положительный эффект гаметофитного отбора. Однако в большинстве случаев однократный гаметофитный отбор менее результативен, чем его сочетание с отбором по спорофиту на стадии проростков. При повторном отборе таких растений по гаметофиту в F_2 снова проявляются мо-

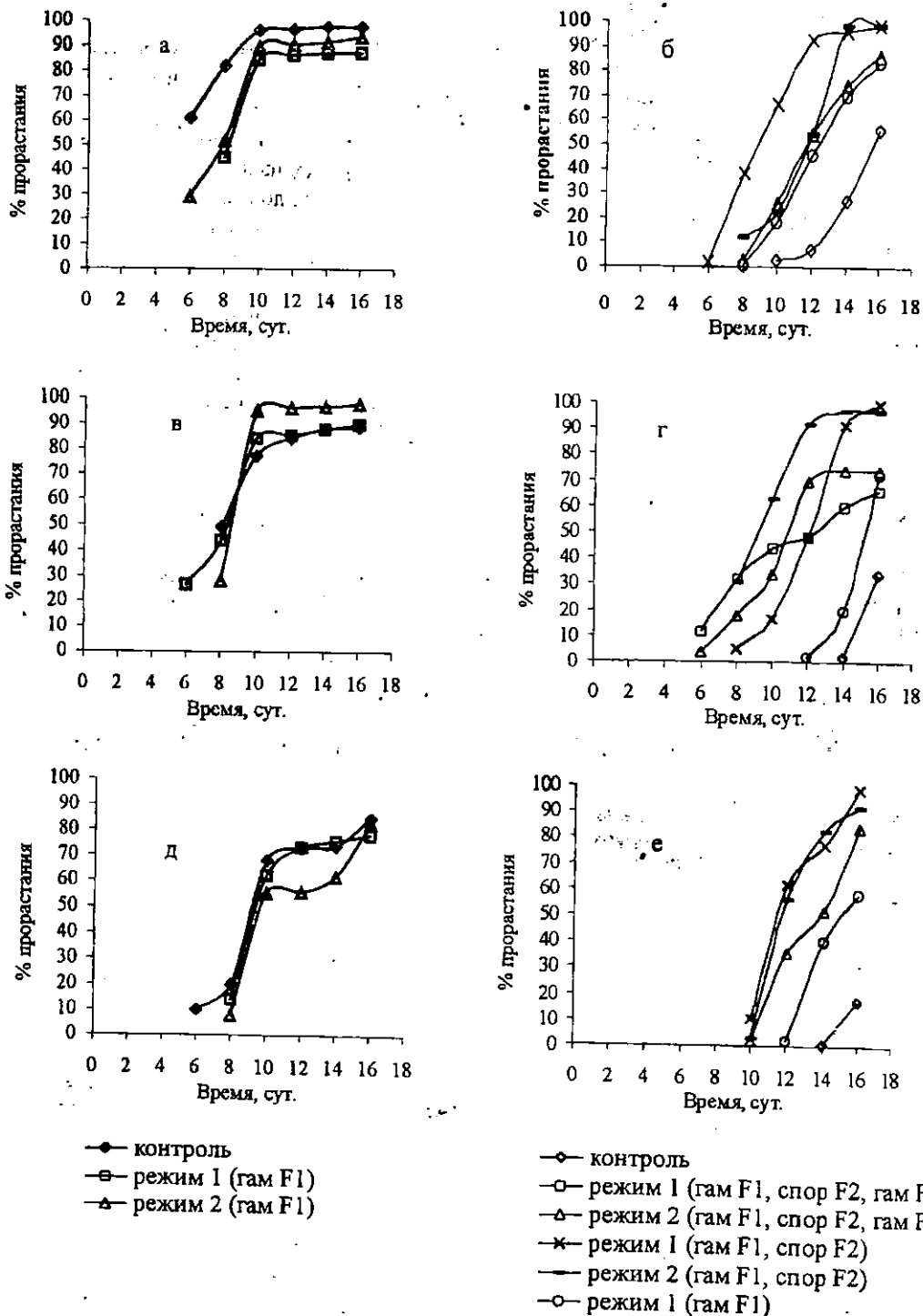


Рис. Динамика прорастания семян F_2 и F_3 (а – Талалихин x Povarek F_2 ; б – Талалихин x Povarek F_3 ; в – Леана x Талалихин F_2 ; г – Леана x Талалихин F_3 ; д – Доходный x Povarek F_2 ; е – Доходный x Povarek F_3)

дификации, что фенотипически в отдельных случаях вызывает замедление роста полученных после недавнего стресса проростков. Последствия стресса могут быть сняты в следующем поколении.

Выводы

1. Обнаружена тесная положительная корреляционная зависимость между устойчивостью к низким температурам микрогаметофита и спорофита в группе раннеспелых образцов томата.

2. Разработаны два режима холодовой обработки пыльцы томата (1 - один час при $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 - три часа при $+1\text{ }^{\circ}\text{C}$), которые позволяют отобрать около 30% наиболее холодоустойчивых пыльцевых зерен и обеспечивают достаточную жесткость отбора.

3. Эффективность однократного пыльцевого отбора в F_1 маскируется модифицирующим действием низких температур на развитие семян. Положительный эффект га-

метной селекции проявляется в F_3 , что выражается в увеличении скорости и конечного процента прорастания семян при низкой температуре. Максимальная эффективность селекции по признаку холодостойкости в F_3 отмечена при использовании двукратного отбора - по мужскому гаметофиту в F_1 и по проросткам в F_2 .

Литература

1. Алпатьев А.В. Помидоры. - Москва: Московский рабочий, 1976. - 240 с.

2. Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы. - Киев: Наукова думка, 1974. - 368 с.

3. Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений. (методология, результаты и перспективы)/Под ред. В.Ф.Пивоварова. - Москва, 2001. - 391 с.

4. Методы гаметной селекции растений: Методические рекомендации / А.Н.Кравченко, В.А.Лях, Л.Г.Тодераш. - Кишинев: Штиинца, 1990. - С.30-31.