ФОРМИРОВАНИЕ ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У ТОМАТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДЛЯ ОПЫЛЕНИЯ ТЕРМООБРАБОТАННОЙ ПЫЛЬЦЫ

FORMATION OF INTRAPOPULATION GENOTYPIC VARIABILITY IN TOMATOES WHEN USING HEAT-TREATED POLLEN FOR POLLINATION

CZU: 635.64:631.527 **https://doi.org/10.59295/spd2024n.25**

Миланья МАКОВЕЙ,
ORCID: 0009-0009-5039-6270
e-mail: m_milania@mail.ru
Институт Генетики, Физиологии и Защиты Растений,
Государственный Университет Молдовы

Summary. *The paper presents the results of studying the effect of tomato pollen heat-treated at 45°C for 8 hours on the degree of genotypic variability in heterogeneous F_1, F_2, F_3 populations obtained by direct and reciprocal crosses. Intra- and interpopulation periodic selections on a complex of traits of male gametophyte (viability, pollen heat resistance, pollen tube length and pollen tube length resistance) are used. It has been shown that cyclic three-fold pollination of the best genotypes (P_1 x P_2 - F_1 x A - F_1 x B and F_2 x A - F_2x B) with preheated pollen increases the probability of combination of desirable genes influencing the resistance of genotypes in populations and can be used to improve parental forms, obtain new resistant genotypes, as well as to increase the effect of heterosis in F_1 hybrids to high-temperature stress.*

Keywords**:** *heat-treated pollen, hybrid population, resistance, tomato, variability*.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение устойчивости растений к воздействию экстремальных факторов среды, является одним из приоритетных направлений как фундаментальных, так и прикладных исследований [1, 2, 3, 4, 5]. Генотипоспецифические реакции разных культур и их адаптационные механизмы в значительной степени определяются степенью жесткости стрессовых факторов внешней среды до и во время цветения растений [2, 6]. Как считают авторы, именно влияние разных стрессоров во время формирования и развития мужских гаметофитов и выхода их из пыльников являются причиной резкого снижения и потери урожая. Поэтому, при рассмотрении влияния взаимодействия таких факторов как «генотип х среда» и в целом эволюционных сил, действующих в популяциях высших растений, принципиально важно учитывать роль мужского гаметофитного отбора [7]. Возможность вовлекать в искусственный отбор большое количество генотипов [8, 9], регулировать «жесткость» отбора в условиях, которые можно контролировать [10], указывает на реальность разработки

эффективных подходов к выделению ценных генотипов с использованием популяций пыльцы как тест-системы для исследования их адаптивного потенциала в резко изменяющихся условиях внешней среды [11]. У томата как самоопылителя с низкой вероятностью перекрестного опыления, особенно важно повышение частоты рекомбинаций. Частота рекомбинации может быть значительно повышена при повторной гибридизации ранее отобранных генотипов. Такая схема селекции носит циклический характер, при котором каждый цикл включает оценку и отбор лучших генотипов, и их последующую гибридизацию [12]. По мнению некоторых авторов, [13] периодический отбор вызывает повторяющиеся изменения в частоте генов в популяциях под давлением отбора и эффективен в том случае, если гибриды, полученные из улучшенных популяций, превосходят гибриды исходных популяций. Такой подход к исследованиям предполагает улучшение популяций гибридов, включая и популяции исходных родительских линий, поскольку генетическая изменчивость в них не исчерпана.

Целью наших исследований было изучение влияния поэтапного реципрокного опыления предварительно термообработанной пыльцой на степень генотипической изменчивости в гетерогенных популяциях и поиск оптимального подхода для отбора ценных форм томата, одновременно сочетающих устойчивость к жаре с другими хозяйственными признаками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальным материалом служили гомозиготные по комплексу хозяйственно–ценных признаков линии томата (Л186, Л197, Л214, Л217, Л479, Л828) и гибридные популяции потомств поколений F_1 F_2 F_3, полученные на основе этих линий в результате прямых и реципрокных скрещиваний. На первом этапе проводили оценку каждой линии по признакам мужского гаметофита (пыльцы) на устойчивость к высокотемпературному стрессу (по 25 растений). От вегетирующих растений собирали пыльцу, обрабатывали температурой 45ºС в течение 8 часов и оценивали жаростойкость по прорастанию пыльцы и длине пыльцевых трубок, путем проращивания её на искусственной питательной среде, содержащей 15% сахарозы и 0,006% борной кислоты в условиях *in vitro* [10]. По результатам оценки отбирали лучшие растения из популяции каждой линии, для последующего проведения скрещиваний и получения гибридов. Прямые и реципрокные скрещивания проводили с использованием для опыления свежесобранную пыльцу (контроль) и пыльцу, предварительно обработанную при температуре 45ºС в течение 8 часов (опыт). Следующий этап – оценка устойчивости растений в гетерогенных популяциях F_1 и отбор наиболее устойчивых с повторным опылением их собственной термообработанной пыльцой (45ºС/8 часов). По идентичной схеме проводится оценка и анализ расщепляющихся популяциях F_2 от разных комбинаций скрещивания (по 100 растений в каждой). Выделенные трансгрессивные рекомбинанты, повторно опыляли их собственной прогретой

при 45ºС/8 часов пыльцой. Потомства наиболее устойчивых и продуктивных растений, выделенных из разных гибридных комбинаций, в каждом варианте исследований объединяли в популяции и оценивали в F_3. Отбирали лучшие с высоким совпадением показателей по признакам пыльцы (жизнеспособность, жаростойкость пыльцы, длина пыльцевых трубок и устойчивость по длине пыльцевых трубок) и показателей количественных признаков (масса и число плодов с растения, общая продуктивность). Они впоследствии служили критерием для проведения сравнительного анализа эффективности использования трехкратного опыления термообработанной пыльцой и его влияния на спектр генотипической изменчивости в гетерогенных популяциях. Биометрию основных параметров растений в популяциях F_1, F_2, F_3 и их родительских форм определяли согласно Международному дескриптору для томата (*Solanum lycopersicum* L.) [14]. Учет продуктивности растений по общепринятым методикам [15]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием классических методов [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ внутрипопуляционной генотипической изменчивости в результате использования для опыления термообработанной пыльцы, выявил широкий размах вариабельности в гетерогенных популяций F_1, F_2 и F_3 по характеру проявления признаков мужского гаметофита (пыльцы), отражающих степень устойчивости генотипов. Выраженные различия имели место по исследованным признакам в вариантах опыт – контроль как внутри популяции одной гибридной комбинации, так и между ними, в том числе, и в зависимости от генотипических особенностей родительских линий, использованных в скрещиваниях (таблицы 1 и 2).

Оценка спектра генотипической изменчивости в гетерогенных популяциях F_1 на стадии спорофита (прорастание семян и формирование зародышевого корешка на фоне высокой температуры -43°С) показала более высокую однородность, чем по признакам мужского гаметофита (прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок). Совпадение высоких показателей изученных признаков на разных стадиях онтогенеза позволило выделить лучшие растения из каждой гибридной комбинации. Повторное их опыление термообработанной пыльцой (2018 год) и анализ их потомств в F_2 (2019 год), выявляет широкий размах изменчивости по признаку «жаростойкость пыльцы». В расщепляющихся популяциях F_2 от разных комбинаций, полученных во втором цикле опыления прогретой пыльцой, обнаруживается большее число генотипов как с крайне низкими (8,2%-13,2%), так и крайне высокими показателями (78,7%-101,6%), относительно опыленных свежей пыльцой (контроль). Это наглядно демонстрируют лимиты значений (min – max) показателя признака “жаростойкость пыльцы» по каждой комбинации (опыт – контроль) (табл. 1). Тогда как по признаку «устойчивость по длине пыльцевых трубок» в популяциях F_2 спектр генотипической изменчивости уже. Процент

генотипов с короткими пыльцевыми трубками по сравнению с контролем очень низкий и в зависимости от комбинации варьирует от 3,4% до 11,4%. В то время, как у более чем 50,3% генотипов в популяциях разных комбинаций, имели длинные пыльцевые трубки от 62,5 до 124 д.о.м. (табл. 2). В расщепляющихся популяциях F_2, по всем комбинациям независимо от уровня устойчивости родительских форм, показатели признаков «жаростойкость пыльцы и устойчивость по длине пыльцевых трубок» выше, чем в контроле.

Таблица 1. Вариабельность показателей признаков «жизнеспособность и жаростойкость пыльцы» в гетерогенных популяциях F_1, F_2, F_3, полученных от опыления термообработанной при 45°C в течение 8 часов пыльцой

Комбинация гибрида	Гибриды поколения F_2 – 2019 год			Гибриды поколения F_3 – 2020 год		
	Жизнеспособность, %	Жаростойкость, %	К исходному F_1, %	Жизнеспособность, %	Жаростойкость, %	К исходному F_1, %
Л186 х Л217	63,7 ± 0,92	79,1	137,9	52,4 ± 1,22	104,5	107,8
min - max	18 – 72,6	30,0 – 86,0	139,7	31,4 – 72,1	47,6 –116,5	162,0
Л217 х Л186	69,6 ± 1,87	84,5	116,0	67,2 ± 1,04	91,5	151,7
min - max	31,0 – 80,0	28,0 – 93,5	141,2	36,4 – 83,6	51,1 –104,7	158,8
Л214 х Л828	88,6 ± 2,11	102,0	98,4	92,8 ± 2,14	112,0	100,1
min - max	42,5 –106,0	33,0 – 124,0	123,7	98 – 122	56,0 –120,0	139,4
Л828 х Л214	87,4 ± 1,56	105,4	88,3	86,4 ± 1,96	111,1	87,9
min - max	33,0 – 96,5	40,0 – 110,0	130,6	71 – 110	63,5 –118,1	129,0
Л479 х Л198	52,9 ± 1,33	62,4	100,6	48,6 ± 1,67	70,9	90,0
min - max	22,5 – 68,2	20 – 94,5	118,4	23 – 62,5	36,8 – 91,0	107,3
Л198 х Л479	54,6	58,4	120,8	49,8 ± 1,07	63,3	90,5
min - max	26,0 – 62,3	20,7 – 71,7	117,7	39 – 71,4	43,5 – 82,6	104,4
Исходные гибриды F_1 (контроль – опыление свежесобранной пыльцой)						
Л186 х Л217	22,8 ± 0,18	38,0		14,2 ± 0,26	47,9	
min - max	5,2 – 32,6	13,9 – 46,2		5,6 – 27,3	24,7 – 6,2	
Л217 х Л186	21,3 ± 0,33	46,5		11,4 ± 0,19	38,2	
min - max	6,3 – 30,0	22,2 – 53,3		2,3 – 20,2	22,8 – 46,4	

Л214 x Л828 **min - max** Л828 x Л214 **min - max**	25,1 ± 0,51 16,2 – 38,4 28,2 ± 0,61 21,6 – 54,7	50,0 38,2 – 61,4 52,7 36,4 – 70,1		33,1 ± 0,44 14,0 – 36,5 40,1 ± 0,37 20,4 – 47,1	63,9 36,1 – 70,0 62,8 21,0 – 85,4	
Л479 x Л198 **min - max** Л198 x Л479 **min - max**	21,7 ± 0,14 9,1 – 28,6 24,8 ± ,28 6,4 – 31,2	31,1 13,4 – 38,1 34,7 16,2 – 43,4		26,0 ± 0,50 8,1 – 34,0 21,4 ± 0,43 5,5 – 30,2	44,6 19,2 – 53,0 39,2 16,1 – 46,8	

Повторное опыление лучших растений в F_1, а затем и в F_2 приводит к выровненности популяций F_3, где генотипов с крайне низкими показателями изучаемых признаков пыльцы практически нет или обнаруживаются крайне редко, но при этом число генотипов с высокими показателями признаков значительно больше (табл. 1 и 2).

Индивидуальный анализ популяций гибридов поколения F_3 по жаростойкости пыльцы показал, что в комбинации Л186 х Л217 от прямого скрещивания, 52,7% генотипов в популяции имели средний уровень жаростойкости пыльцы (28,6%-44,1%), у остальных она была высокой (52,6%-88,6%). В варианте от реципрокного скрещивания (Л217 х Л186) генотипов со средней жаростойкостью пыльцы (26,1% - 39,4%) было больше (61,2%), у остальных (38,8%) показатель признака варьировал от 49,7% до 74,1% (табл. 1). По признаку «устойчивость пыльцевых трубок» у 68,3% генотипов в популяции от прямого скрещивания, проросшие после термообработки пыльцевые зерна формировали длинные трубки (63,6-72,1 д.о.м.). В варианте от реципрокного скрещивания этот показатель чуть выше и составляет 71% с длиной пыльцевых трубок от 55,4 до 83,6 д.о.м. Как видим различия в показателях изученных признаков в зависимости от направления скрещивания не столь выражены.

В комбинации Л214 х Л828 цикличное трехкратное опыление предварительно прогретой пыльцой привело к получению популяций, где 82,2% генотипов в варианте от прямого и 87,4% реципрокного скрещивания, в поколении F_3 имели жаростойкость пыльцы 60,0% - 104,8%, и 58,6% - 97,4% соответственно, при длине пыльцевых трубок 98,0-122 д.о.м. и 71-110 д.о.м. соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Вариабельность показателей признаков «длина пыльцевых трубок и устойчивость по длине трубок» в гетерогенных популяциях F_1, F_2, F_3, полученных от опыления термообработанной при 45°С в течение 8 часов пыльцой

Комбинация гибрида	Гибриды поколения F_2 – 2019 год			Гибриды поколения F_3 – 2020 год		
	Длина трубок, д. о. м.	Устойчивость трубок,%	К исходному F_1, %	Длина трубок, д. о. м.	Устойчивость трубок,%	К исходному F_1, %
Л186 х Л217	63,7 ± 0,92	79,1	137,9	52,4 ± 1,22	104,5	107,8
min - max	18 – 72,6	30,0 – 86,0	139,7	31,4 – 72,1	47,6 – 16,5	162,0
Л217 х Л186	69,6 ± 1,87	84,5	116,0	67,2 ± 1,04	91,5	151,7
min - max	31,0 – 80,0	28,0 – 93,5	141,2	36,4 – 83,6	51,1 –104,7	158,8
Л214 х Л828	88,6 ± 2,11	102,0	98,4	92,8 ± 2,14	112,0	100,1
min - max	42,5 –106,0	33,0 – 124,0	123,7	98 – 122	56,0 –120,0	139,4
Л828 х Л214	87,4 ± 1,56	105,4	88,3	86,4 ± 1,96	111,1	87,9
min - max	33,0 – 96,5	40,0 – 110,0	130,6	71 – 110	63,5 –118,1	129,0
Л479 х Л198	52,9 ± 1,33	62,4	100,6	48,6 ± 1,67	70,9	90,0
min - max	22,5 – 68,2	20 – 94,5	118,4	23 – 62,5	36,8 – 91,0	107,3
Л198 х Л479	54,6	58,4	120,8	49,8 ± 1,07	63,3	90,5
min - max	26,0 – 62,3	20,7 – 71,7	117,7	39 – 71,4	43,5 – 82,6	104,4
Исходные гибриды F_1 (контроль – опыление свежесобранной пыльцой)						
Л186 х Л217	46,2 ± 1,21	56,6		48,6 ± 1,04	64,5	
min - max	21,4 – 60,0	11,7 – 66,4		20,2 – 55,6	23,0 – 77,9	
Л217 х Л186	60,0 ± 2,30	59,7		44,3 ± 2,03	57,6	
min - max	28,5 –74,0	16,3 – 70,2		16,0 – 54,0	18,3 – 74,6	
Л214 х Л828	90,0 ± 1,94	82,5		92,7 ± 2,82	80,3	
min - max	30,5 – 98,0	19,4 – 97,8		41,0–109,0	21,2 –107,7	
Л828 х Л214	99,0 ± 2,0	80,7		98,4 ± 3,11	86,1	
min - max	32,0 – 114	22,4 – 91,1		37,0–116,0	30,0 –101,0	
Л479 х Л198	52,6 ± 1,64	52,7		54,0 ± 1,44	66,1	
min - max	31,0 – 62,5	12,6 – 72,4		26,0 – 64,7	21,4 – 77,9	
Л198 х Л479	45,2 ± 1,09	49,6		55,0 ± 1,02	60,7	
min - max	27,0 – 51,3	14,4 – 65,3		10,0 – 71,5	17,2 – 81,3	

В данной комбинации, цикличное трехкратное опыление термообработанной пыльцой в сочетании с наличием высокой устойчивости у родительских линий, привело к получению высокоустойчивой популяции, как в варианте прямого, так и реципрокного скрещиваний.

Иные результаты получены по комбинации Л479 х Л198 и наоборот Л198 х Л479. Эти родительские линии характеризуются как неустойчивые к высокой температуре. В данной комбинации, большая часть генотипов (64,7% и 61,9%) в популяциях F_3 от прямого и реципрокного скрещиваний имели низкие

значения признака «жаростойкость пыльцы» – 21,3%-30,2 (табл. 1). По признаку «устойчивость пыльцевых трубок» значения несколько выше. У 68,3% генотипов длина трубок составила 50,5-71,5 д.о.м. Пыльцевые зерна остальных генотипов формировали трубки меньшей длины (23,6-39,7 д.о.м.). Идентичные результаты получены и в популяции от реципрокного скрещивания (табл. 2).

Таким образом, результатами исследований показано, что значения изученных признаков у генотипов в популяциях F_1, полученных от опыления термообработанной пыльцой были выше, чем у их родительских линий. Установлено, что спектр изменчивости в популяциях F_2 (потомства F_1, опыленные прогретой пыльцой) был значительно уже, чем в варианте опыления свежей пыльцой (контроль). Это происходило за счет, наличия в популяциях большего числа генотипов со средними значениями признаков как по пыльце, так и длине пыльцевых трубок. В то же время в популяциях F_2 выявлено наличие большего числа генотипов, значения признаков у которых превышают таковые лучшего родителя и отсутствие генотипов с крайне низкими показателями. В популяциях генерации F_3, потомств лучших рекомбинантов, обнаруживается больше генотипов с высокими показателями обоих признаков мужского гаметофита и стабильным их проявлением, что характеризует их как устойчивые к высокотемпературному стрессу. Последовательный, поэтапный отбор с использованием для опыления предварительно прогретой пыльцы оказался наиболее эффективным в гибридной комбинации Л214 х Л828 как от прямого, так и реципрокного скрещиваний, из популяций которых удалось выделить новые линии томата с оригинальным сочетанием устойчивости к высокотемпературному стресс-фактору с другими хозяйственно-ценными признаками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цикличное трехкратное опыление (P_1 х P_2 – F_1 х А – F_1 х В и F_2 х А – F_2 х В) предварительно термообработанной пыльцой увеличивает вероятность сочетания желательных генов влияющих на устойчивость генотипов и компоненты урожайности и может быть использован для улучшения родительских форм, получения новых генотипов, сочетающих устойчивость к высокой температуре с другими селекционно-ценными признаками, а также повышения эффекта гетерозиса у гибридов F_1 к высокотемпературному стрессу.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. ДРАГАВЦЕВ, В.А., ЛОПАТИНА, Л.М. Управление продуктивностью с-х культур на основе закономерностей их генетических и фенотипических изменений при смене лимитов внешней среды. Краснодар. 2003. 208 с. ISBN: 5-98272-006-2.
2. KANG, M.S. Breeding: Genotype-by-environment interaction. In: R.M. Good-

man (ed.). Encyclopedia of Plant and Crop Science. New York: Marcel-Dekker; 2004. pp. 218-221. ISBN: 0491334386.
3. ЖУЧЕНКО, А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы) теория и практика. М.: Агрорус. 2009. Том II. с. 647-651. ISBN: 5-9900364-1-8.
4. LUPAȘCU, G., GAVZER, S. Influenţa etapei ontogenetice a plantei-gazdă şi condiţiilor climatice asupra complexului fungic care produce putregaiul de rădăcină la grâu. Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii, 2020, Nr 2 (341), pp. 80-86.
5. DE STORME, N, GEELEN, D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. Plant Cell Environ. 2014. No 37(1). pp. 1-18.
6. ЖУЧЕНКО, А. А. Мобилизация генетических ресурсов цветковых растений на основе их идентификации и систематизации. Москва. 2012. 581 с. ISBN: 978-5-85941-452-9.
7. PFAHLER, P.L. Comparative effectiveness of pollen genotype selection in Higher plants. In: Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding. N.Y. 1982. pp. 361-366. ISBN: 978-0444007384.
8. MULCAHY, D.L., MULCAHY, G.B., POPP, R., FONG, et al. Pollen selection for stress tolerance or the advantage of selecting before pollination. In: Sexual reproduction in higher plants. 1988. pp. 43-50.
9. FROVA, C., PORTALUPPI, P., VILLA, M., SARI-GORLA, M. Sporophytic and gametophytic components of thermotolerance effected by pollen selection. In: *J. of Heredity.* 1995. Vol. 86. No 1. pp. 50-54.
10. МАКОВЕЙ, М.Д. Селекция томата на устойчивость к стрессовым абиотическим факторам с использованием гаметных технологий. Кишинев. 2018. 473 с. ISBN: 978-9975-56-565-3.
11. МАКОВЕЙ, М. Метод отбора и его влияние на интенсификацию селекционного процесса. В: *Овощи России.* Москва. 2020. № 5. с. 21-25.
12. КИЛЬЧЕВСКИЙ, А.В., АНТРОПЕНКО, Н.Ю., ПУГАЧЕВА, И.Г. Результаты циклической гаметофитной и спорофитной селекции томата на холодостойкость и продуктивность. Известия Национальной академии наук Беларуси (Серия Аграрных наук*)*. 2007. № 2. с. 53-57. ISSN: 1817 – 7204.
13. ТАРУТИНА, Л.А., МИШИН, Л.А., КАВЦЕВИЧ, В., ХОТЫЛЕВА, Л.В. Реализация генотипической изменчивости у томата (*Lycopersicon esculentum* Mill) в условиях защищенного грунта в процессе периодического отбора. Сельскохозяйственная биология. 2013, № 3. с. 45 - 50.
14. Tomato - UPOV (*Solanum lycopersicum* L.) V 2012 0007 TG/44/11 Rev. Geneva. 15. ORZAN, V., IONESCU, C. Metodica și Tehnica Experimentala pentru incercarea soiurilor de legume de câmp. București, 1989. 268 p. 16. ДОСПЕХОВ, Б.А. Методика опытного дела. М.: Агромпромиздат, 1985. 416 с.