

УДК 635.649:631.526.32:581.33



ПРЕОДОЛЕНИЕ ОДНОСТОРОННЕЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ СОРТОВ ПЕРЦА СЛАДКОГО БЕЛОСНЕЖКА И КАРЛИК ПУТЕМ ХОЛОДОВОГО СТРЕССИРОВАНИЯ СОБСТВЕННОЙ ПЫЛЬЦЫ

Козарь Е.Г. – к. с.-х. наук, в.н.с. лаб. гаметной селекции

Бландинская О.А. – м.н.с. лаб. гаметной селекции

Беспалько Л.В. – к. с.-х. наук, с.н.с. лаб. зеленных и пряновкусовых культур

Балашова Н.Н. – д.с.-х.н., профессор, член-корреспондент АН РМ, г.н.с. лаб. гаметной селекции

Пивоваров В.Ф. – академик РАН

Пышина О.Н. – зам. директора по науке

ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур Россельхозакадемии
143080, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14
E-mail: gameta233@mail.ru

В статье дано научное обоснование методики преодоления односторонней перекрестной несовместимости сортов перца сладкого Белоснежка и Карлик (*Capsicum annuum* L.) путем предварительного нанесения на рыльце материнского растения собственной криообработанной пыльцы (фертильной, но потерявшей оплодотворяющую способность) с целью инициации необходимых изменений в тканях пестика, что обеспечивает прорастание пыльцевых трубок чужеродной пыльцы, успешное оплодотворение и завязывание гибридных семян.

Ключевые слова: перец сладкий, *Capsicum annuum* L., пыльца, жизнеспособность, несовместимость, холодовой стресс, криообработка, опыление, пыльцевые трубки, оплодотворение, завязываемость плодов и семян.

Угомоморфных растений процессы, препятствующие оплодотворению, происходят между пыльцой и тканями пестика, причем реакция при гаметофитной несовместимости определяется гаплоидным генотипом пыльцы (состоянием мно-

жества аллелей генов несовместимости). Пыльца прорастает, но пыльцевые трубки, начавшие путь по столбику, через определенное время прекращают свой рост. Этот тип характерен для семейств *Solanaceae* (томат, паслен), *Rosaceae* (яблоня,

роза), *Fabaceae* (бобы) и др. Реакция пыльцы со спорофитным контролем несовместимости определяется генотипом диплоидного материнского растения и зависит от взаимодействия аллелей генов несовместимости пыльцы и пестика. Она протекает

обычно в форме подавления прорастания пыльцевых зерен на рыльце пестика. Этот тип несовместимости характерен для семейств *Brassicaceae* (капуста, редька), *Asteraceae* (скерда) и другие [1-5]. Однако разделение видов на гаметофитные и спорофитные в отношении контроля несовместимости весьма относительно и у некоторых видов возможно сочетание отдельных признаков данных систем [4,6]. При этом реакция несовместимости на первых этапах оплодотворения (на уровне рыльца и столбика) может являться результатом разных, но часто взаимосвязанных процессов: отсутствием необходимых факторов стимуляции и активным торможением прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок путем синтеза ингибиторов [7].

Для растений, у которых реакция несовместимости локализована на поверхности рыльца, одной из причин несовместимости может быть отсутствие подходящей среды для прорастания пыльцы [4,8]. У видов с «влажной» поверхностью рыльца гидратация пыльцы, как правило, начинается сразу же, после ее попадания в жидкий питательный матрикс (или водно-липидную эмульсию), но в случае несовместимости большая часть пыльцы может оставаться не проросшей или наблюдается существенная задержка ее прорастания, образование коротких пыльцевых трубок, неспособных вращаться в ткани пестика [5,9]. У растений, имеющих рыльце, покрытое слоем кутикулы, обводнение наблюдается только после ее разрыва (лизиса) и высвобождения секрета рыльца, поэтому при несовместимой комбинации скрещивания проникновение пыльцевых трубок в столбик затруднено, из-за неспособности рыльца активировать кутинолизующую ферментативную систему пыльцы [10-14]. Тем не менее, барьер несовместимости в области рыльца является наименее специфичным, и даже при

отдаленной гибридизации у различных культур наблюдается прорастание в ткани столбика достаточного количества пыльцевых зерен [15,16]. В дальнейшем несовместимость проявляется в процессе взаимодействия пыльцевых трубок с тканями столбика. Темп роста пыльцевых трубок при чужеродном опылении замедляется и/или прекращается, что в большинстве случаев и является основным препятствием для скрещивания при гаметофитном контроле несовместимости [1,15,17-20]. При этом блокировка роста часто сопровождается нарушением трофической реакции (трубки меняют направление роста) и морфологическими изменениями пыльцевых трубок: вздутие кончика, разветвление, утолщение стенок, отложение каллозы и т.д. [15,21-24].

Перец сладкий (*Capsicum annuum* L.) является факультативным самоопылителем и относится к самофертильным видам, растения которых, как правило, легко скрещиваются между собой. Обычно у этого вида перца трудности гибридизации возникают в основном при получении межвидовых гибридов [25,26], однако, у сортов Карлик и Белоснежка из коллекции ВНИИССОК выявлена односторонняя межсортовая «нескрещиваемость» при их использовании в качестве материнского компонента при гибридизации. Изучая это явление на примере сорта Белоснежка, отмечено проявление признаков, характерных для обоих типов гомоморфной несовместимости. Через два часа после нанесения на рыльце, чужеродная пыльца хорошо прорастает, но в отличие от опыления собственной пыльцой, не происходит лизиса и образование проводящего канала в тканях столбика, что препятствует нормальному росту трубок и оплодотворению. При этом часто отмечается нарушение трофической реакции прорастающих пыльцевых трубок относительно поверхности рыльца [26]. В ряде ком-

бинаций у данного сорта все же может происходить частичный лизис проводниковой ткани и на вторые сутки после опыления в завязи отдельных пестиков отмечается появление пыльцевых трубок, однако гибридные плоды чаще всего не завязываются или опадают на ранних стадиях развития [27].

В отличие от Белоснежки, у сорта Карлик практически не происходит образование открытого канала, даже при опылении собственной пыльцой. Пыльцевые трубки растут внутри плотного матрикса проводящей ткани столбика, которая при самоопылении постепенно лизируется и частично разрыхляется. В случае нанесения чужеродной пыльцы этого не происходит, хотя часть пыльцевых зерен на рыльце его пестика прорастает [27]. То есть, односторонняя несовместимость у сортов Белоснежка и Карлик во многом обусловлена морфофизиологическими особенностями строения их пестика, характером взаимоотношения между пыльцевыми зернами, клетками рыльца и столбика на ранних этапах прорастания, особенностями метаболизма материнского растения в период формирования плодов (конкуренция, внутренний отбор), что отмечено также и у ряда других культур [2,3].

Анализ литературы и экспериментальных данных свидетельствуют о том, что односторонняя несовместимость сортов Белоснежка и Карлик не является абсолютной и ее можно преодолеть. Известны различные пути преодоления несовместимости: скрещивание и удаление всех других цветков и бутонов на материнском растении, добавление пыльцы материнского вида к пыльце отцовского компонента скрещивания, опыление смесью пыльцы различных сортов видов или родов, срезка различных частей пестика (рыльце, столбик), применения фитогормонов, биотехнологические методы и другие [15,28]. Использование методов биотехнологии (опыление завязей и

отделенных семяпочек в условиях *in vitro*) для преодоления «нескрещиваемости» у образцов перца сладкого с данным типом несовместимости не принесло ожидаемых результатов [26]. Положительный результат был получен при предварительном нанесении на пестик материнского растения собственной пыльцы с последующей срезкой верхней части столбика и опылением пыльцой несовместимого отцовского компонента скрещивания (комбинация Белоснежка х Здоровье). В данном случае, по мнению автора [26], прорастание собственной пыльцы стимулирует лизис проводниковой ткани и образование канала в столбике, по которому в дальнейшем пыльцевые трубки чужой пыльцы достигают завязи.

В данной работе для решения проблемы нескрещиваемости был использован другой методический подход инициации процесса оплодотворения при гибридизации, основанный на использовании особенности реакции мужского гаметофита перца сладкого на воздействие низкотемпературного стресса. Ранее было показано, что зрелая пыльца перца сладкого в воздушно-сухом состоянии выдерживает промораживание (криообработка), сохраняя в течение суток оплодотворяющую способность, тогда как при высокой влажности среды чувствительность пыльцы к данным температурам существенно выше, в результате чего, опыление часто приводит к образованию бессемянных плодов, хотя пыльца остается фертильной [29-31].

Цель исследований – разработать методику преодоления нескрещиваемости сортов перца сладкого Белоснежка и Карлик с использованием предварительного нанесения криообработанной собственной пыльцы на рыльце пестика материнской формы перед опылением пыльцой отцовского компонента.



Материалы и методы

При отработке элементов методики были проведены серии независимых экспериментов (по двухфакторной схеме) по оптимизации параметров: режима криообработки материнской пыльцы (условия влажности, экспозиция) и длительности временного интервала между нанесением пыльцы компонентов скрещивания (условия влажности, период ожидания), с последующей оценкой гибридности полученного потомства в различных комбинациях скрещивания. В работу были включены образцы перца сладкого из коллекции лаборатории селекции и семеноводства пасленовых культур ВНИИССОК: Белоснежка, Карлик,

Желтый букет, Маэта, Л-70, Л-Фех, Л- Мед.

Пыльцу собирали в утренние часы с раскрывшихся цветков. Свежесобранную пыльцу материнских растений (Белоснежка, Карлик) тщательно перемешивали, делили на части (по количеству вариантов) и подвергали криообработке при $-5\pm 2^\circ\text{C}$ в условиях различной влажности (сухая камера, влажная камера, дистиллированная вода) в течение 3-24 часов, после чего изучали ее функциональные пара-



Кастрация бутона



КАРЛИК

БЕЛОСНЕЖКА

метры в условиях *in vitro* (жизнеспособность, рост пыльцевой трубки) и при опылении *in vivo* (оплодотворяющая способность, стимулирующая активность при гибридизации).

Проращивание пыльцы *in vitro* проводили на оптимизированной питательной среде [32], в трехкратной повторности согласно общепринятой методике [33, 34]. Фиксацию и окрашивание проводили через 3 часа с помощью дифференциального красителя [35]. Полученные препараты изучали и фоторегистрировали с помощью микроскопа фирмы Carl Zeiss с фотонасадкой Digital Camera for Microscope DCM 300. Для анализа фотоматериалов использовали специализированную программу Scope Photo 3.0. Длину пыльцевых трубок измеряли в относительных единицах, жизнеспособность определяли как процент проросших к общему

числу пыльцевых зерен (не менее 200 в одной повторности).

Нанесение криобработанной пыльцы на рыльце пестиков осуществляли в день кастрации бутонов материнского растения (фаза «белого» бутона, за день до раскрытия цветка). Опыление кастрированных бутонов свежесобранной пыльцой отцовского компонента проводили через определенные интервалы времени (в течение часа), после нанесения на рыльце криобработанной собственной пыльцы. В каждом варианте опыляли не менее 5 бутонов, которые индивидуально этикетировали. Опыты проводили в фазу полного цветения растений с удалением только первых самоопыленных цветков.

В процессе вегетации регистрировали количество опавших опыленных бутонов и завязей. Сбор гибридных плодов, выделение и подсчет семян проводили в фазу биологической спелости плодов. Массу 1000 семян и всхожесть определяли согласно общепринятым методам [36]. Гибридность опытных образцов оценивали по морфологическим признакам (тип растений, форма, окраска и масса плодов и др.) и продуктивности растений [37]. Агротехника выращивания – общепринятая для перца сладкого в условиях необогреваемых пленочных теплиц ЦНЗР [38]. Математическую и статистическую обработку полученных результатов выполняли по Доспехову Б.А. [39] и с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003.

Результаты исследований

В первой серии опытов изучали влияние влажности среды и длительности холодного стрессирования на функциональные характеристики и оплодотворяющую способность материнской пыльцы сорта Белоснежка в комбинациях Желтый букет х Белоснежка и Белоснежка х Белоснежка. Для чего собранную пыльцу сорта Белоснежка делили на части,

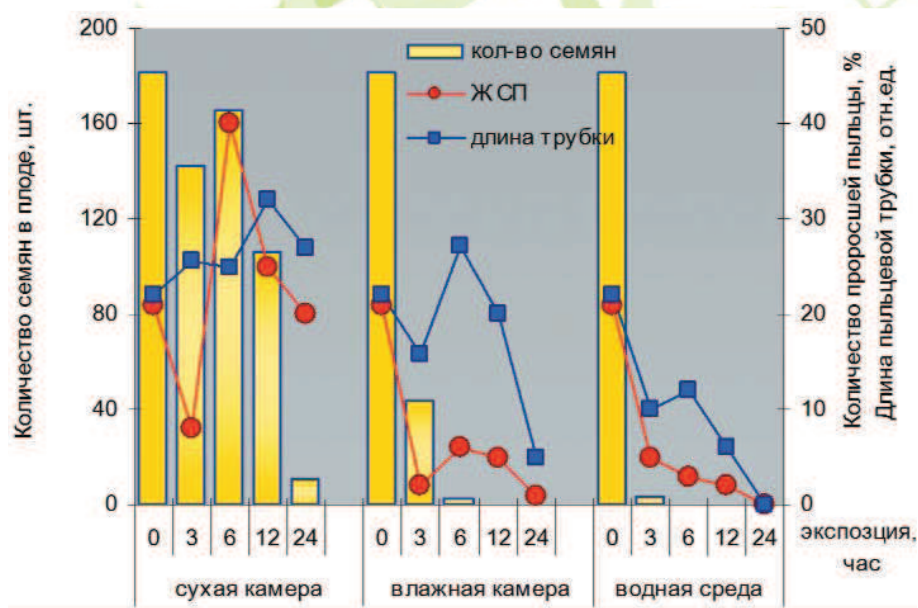


Рис. 1. Параметры пыльцы сорта Белоснежка, подвергнутой холодному стрессированию при -5°C в различных условиях влажности и экспозиции; количество семян в плоде при опылении бутонов криобработанной пыльцой (комбинация Желтый букет х Белоснежка)

помещали в герметично закрывающиеся конические пробирки с различной влажностью среды – сухая камера (ОВВ <60%), влажная камера (ОВВ 100%), дистиллированная вода (0,1 мл), и подвергали криобработке в морозильной камере в течение 3, 6, 12 и 24 часов, затем высевали на питательную среду и проводили опыление кастрированных бутонов. Контроль – свежесобранная пыльца.

Анализ полученных данных подтвердил, что жизнеспособность пыльцы и ее оплодотворяющая способность после криобработки в условиях влажной камеры снижалась более резко по сравнению с сухим хранением (рис.1), хотя по показателю «длина пыльцевой трубки» при экспозиции до 12 часов оба варианта были сравнимы. Через сутки после промораживания в сухой камере, количество проросшей пыльцы *in vitro* оставалось на уровне контроля, но количество гибридных семян в завязавшихся плодах комбинации Желтый букет х Белоснежка, снизилось почти в 10 раз. Нанесение пыльцы подвергнутой 12-часовой криобработке в условиях влажной камеры приводило к образованию бессемянных плодов, тогда как в варианте с

24-часовой экспозицией плоды не завязывались, хотя пыльца оставалась фертильной и ее жизнеспособность была на уровне 1%. То есть, высокая влажность среды является провоцирующим условием быстрого подавления оплодотворяющей способности пыльцы перца сладкого при низкотемпературном стрессировании (рис.1).

Опыление кастрированных бутонов сорта Белоснежка собственной криобработанной пыльцой (комбинация Белоснежка х Белоснежка) в варианте с влажной камерой после 12-часовой экспозиции приводило к образованию единичных плодов с небольшим количеством семян (до 40 штук). После промораживания в течение 24 часов оплодотворяющая способность пыльцы полностью терялась и отмечалось лишь разрастание завязей опыленных бутонов, которые впоследствии, как правило, опадали, реже давали «пуфики» (в варианте с водной средой). В данном случае, жизнеспособная часть криобработанной пыльцы, прорастая в ткани пестика, запускала начальные этапы процесса оплодотворения, но большинство образовавшихся «ослабленных» пыльцевых трубок

не достигало завязи, возможно, формируя при этом нежизнеспособные спермии. Аналогичные эффекты действия на прорастание пыльцы низких температур в сочетании с высокой влажностью пыльцы были отмечены и на других культурах [40,41]. На основании полученных данных был сделан вывод, что наиболее приемлемым вариантом низкотемпературной обработки пыльцы, как сигнального элемента преодоления несовместимости и перестройки тканей пестика при гибридизации изучаемых сортов перца сладкого, является ее криообработка при температурах -5 ± 2 °C в условиях высокой влажности среды и экспозиции не менее 24 часов.

Во второй серии опытов изучали влияние продолжительности периода ожидания между нанесением криообработанной материнской пыльцы и опылением пыльцой отцовского компонента на завязываемость плодов и семян. Для этого сначала на рыльце пестика кастрированных бутонов сорта Белоснежка наносили один из вариантов термически обработанной (I – влажная камера, II – водная суспензия, экспозиция 24 часа) собственной пыльцы, затем через интервал в 10 минут в течение часа – свежесобранную чу-

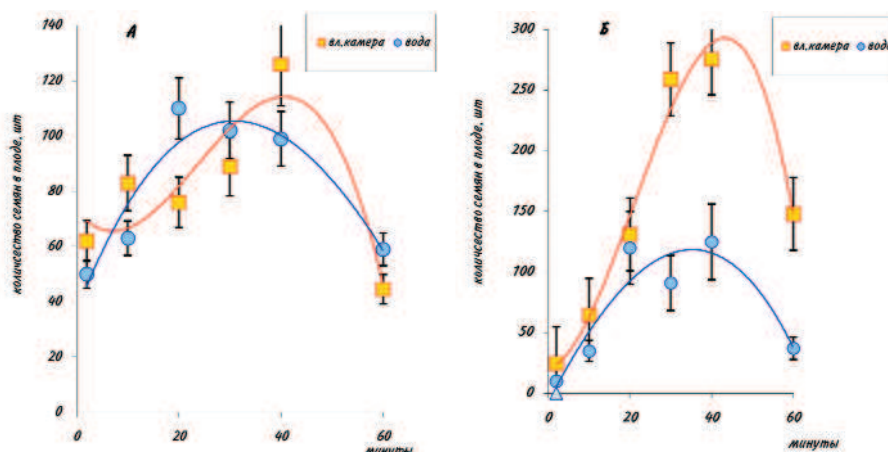


Рис. 2. Масса гибридных плодов (А) и среднее количество семян в плоде (Б) в зависимости от длительности периода между нанесением на рыльце криообработанной пыльцы материнской формы и пыльцы отцовского компонента в комбинации Белоснежка х Желтый букет. Варианты обработки: I – влажная камера (100% ОВВ), II – водная суспензия (вода). Режим обработки: температура -5°C , экспозиция 24 часа.

жеродную пыльцу сорта Желтый букет. В качестве контрольных вариантов в данной серии опытов были: К_к – традиционное опыление пыльцой отцовского компонента без нанесения собственной пыльцы, К₁ и К₁₁ – нанесение только криообработанной собственной пыльцы соответствующего варианта без опыления отцовской пыльцой. Эталонном для сравнения вариант К_э – с использованием методики преодоления несовместимости путем нанесения чужеродной пыльцы на срез пестика через 2 часа, после нанесения на рыльце свежесо-

бранной собственной пыльцы (срез 1/2 части столбика) [26].

Оказалось, что независимо от условий криообработки пыльцы материнской формы, завязываемость гибридных плодов во всех случаях была высокой (85-100%), но более крупные по массе плоды с наибольшим количеством семян завязывались при периоде ожидания в интервале 30-40 минут (рис. 2, табл.1). Различия по массе плодов между вариантами в данном случае были не существенны, но средняя осемененность плода в варианте с предвари-

1. Параметры гибридных семян в зависимости от способа подготовки и времени нанесения пыльцы компонентов скрещивания (комбинация Белоснежка х Желтый букет)

		Количество семян в одном плоде			Масса 1000 семян, г	Всхожесть, %
подготовка ♀ пыльцы*	интервал между нанесением ♀ и ♂ пыльцы	штук		в том числе выполненные, %		
		min - max	среднее			
I	2-20 мин	25-131	74	93	8,0	72
	30-60 мин	148-276	228	94	7,8	74
II	2-20 мин	10-130	55	98	8,1	81
	30-60 мин	15 -125	77	94	7,8	92
Кэ	2 часа	12-85	48	54	6,9	63
	НСП ₀₅		32		0,5	9

* I – термообработка пыльцы в условиях влажной камеры; II – термообработка водной суспензии пыльцы (дистиллированная вода); Кэ – свежесобранная пыльца + срезка 1/2 части пестика

тельным нанесением материнской пыльцы, криобработанной в условиях влажной камеры, была более чем в 2 раза выше, чем в варианте с нанесением водной суспензии пыльцы.

В контрольных вариантах $K_{ж}$, K_1 и K_{II} гибридные плоды не завязались. При использовании метода срезки части столбика после нанесения свежеобработанной материнской пыльцы – вариант $K_э$, завязываемость плодов была ниже (менее 60%), семенность плодов и качество гибридных семян были не высокими (табл.1). Количество выполненных семян составило 54%, масса 1000 семян – менее 7 г, а всхожесть – ниже 65%. В этом отношении варианты с предварительным нанесением криобработанной пыльцы в целом показали лучшие результаты: более высокий процент выполненных семян – > 90%, массу 1000 семян – >7 г и лабораторную всхожесть 72-95%.

Для оценки результативности проведенных скрещиваний, семена из каждого варианта опыта высевали и проводили сравнительный анализ полученных растений по основным селекционным признакам, который показал, что гибридность растений во всех вариантах опыления составила 100%. Большинство из них характеризовались промежуточным типом проявления признаков: габитус растения, форма и масса плодов (рис.3, табл. 2). В технической спелости плоды имели зеленую окраску, как у Желтого букета, а в биологической – красную, как у сорта Белоснежка. По среднему значению и степени изменчивости признака «масса плода» варианты опыта различались незначительно, и составили 84-100 г и $C_v=11-19\%$ соответственно.

Анализ также показал, что в вариантах с использованием криобработанной пыльцы при раннем нанесении пыльцы отцовского компонента в интервале от 2 до 20 минут, как и в варианте со срезкой столбика, в структуре гибридных популяций присутствует небольшое количество растений с

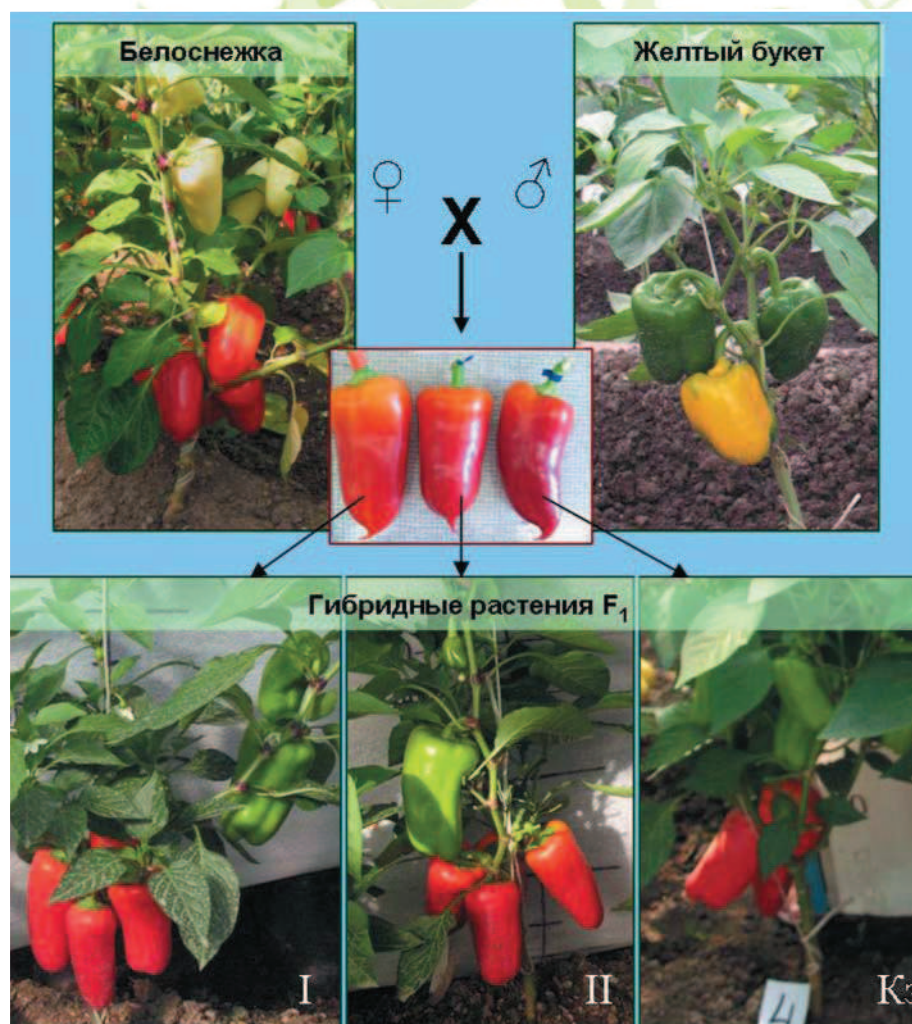


Рис.3. Родительские формы и гибридные растения F_1 разных вариантов опыления: с применением термообработанной материнской пыльцы (I – влажная камера; II – дистиллированная вода) и путем срезки пестика ($K_э$) в комбинации скрещивания Белоснежка х Желтый букет.

низкой продуктивностью (табл.2). Более позднее (≥ 30 минут) нанесение пыльцы отцовского компонента в данных вариантах способствовало смещению баланса в сторону высокопродуктивных форм и, соответственно, увеличению показателя средней продуктивности растений при более равномерном созревании плодов в процессе вегетации. Это более четко выражено во II варианте, где материнская пыльца подвергалась криобработке в виде водной суспензии (табл. 2). Тем не менее, по общей урожайности гибридные популяции всех опытных вариантов превышали материнскую форму (сорт Белоснежка) и были более раннеспелыми, по сравнению с вариантом $K_э$ (срезка столбика). В I варианте опыта (влажная камера) урожайность плодов, в зависимости

от времени ожидания, отличалась незначительно (рис. 4).

Анализируя всю совокупность полученных результатов, был сделан вывод, что метод преодоления нескрещиваемости сортов перца сладкого путем предварительного нанесения криобработанной собственной пыльцы перед гибридизацией повышает вероятность завязывания гибридных плодов, дает возможность получения большего числа гибридных семян с высокой «жизненной силой». При этом опыление пыльцой отцовского компонента лучше проводить через полчаса после нанесения на рыльце кастрированных бутонов материнской криобработанной пыльцы.

Низкое завязывание семян при более коротком сроке ожидания

2. Продуктивность растений в зависимости от периода ожидания между нанесением пыльцы компонентов скрещивания и способа подготовки пыльцы материнского растения (комбинация Белоснежка х Желтый букет)

Вариант опыта		Продуктивность					Масса плода, г		
экспозиция между нанесением ♀ и ♂ пыльцы	подготовка ♀ пыльцы*	штук	средняя, г	процент растений с продуктивностью			средняя	min	max
				<400 г	400-800 г	>800 г			
2-20 мин	I	7	681	6	75	19	93	67	111
	II	6	560	13	80	7	84	84	107
30-40 мин	I	7	682	0	70	30	95	77	130
	II	7	680	0	67	33	97	73	116
2 часа	Кэ	6	659	6	63	31	100	67	126
	HCP ₀₅	1	52				6		

* I – термообработка пыльцы в условиях влажной камеры; II – термообработка водной суспензии пыльцы (дистиллированная вода); III-термообработка водной суспензии пыльцы (дистиллированная вода+м/э); IV – свежесобранная пыльца + срезка 1/2 части пестика через 2 часа

(менее 20 минут) или одновременном нанесении пыльцы отцовского компонента с криообработанной пыльцой материнской формы теоретически может быть связано с разными причинами. С одной стороны это высокая конкуренция пыльцевых зерен материнского и отцовского компонентов на этапе «узнавания» и образования связей в системе пыльца-рыльце [4,23] или преждевременное прорастание последних до начала инициации процессов подготовки тканей пестика к прорастанию пыльцевых трубок. С другой – это эффект депрессии роста пыльцы обоих участников вследствие накопления при криообработке материнской пыльцы стрессовых факторов [42], что в итоге влияет на оплодотворяющую способность пыльцы отцовской формы. Увеличение продолжительности периода ожидания, по-видимому, способствует снятию большинства этих проблем и успешному оплодотворению при гибридизации.

С использованием данной методики были проведены скрещивания сорта Белоснежка (материнская форма) и в других комбинациях (третья серия опытов). В результате было выявлено, что в некоторых комби-

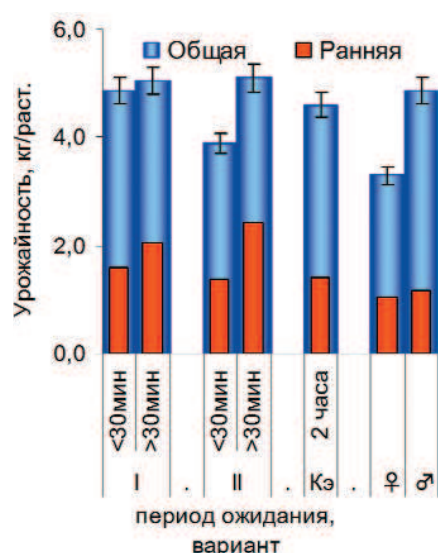


Рис.4. Урожайность родительских форм и гибридного потомства F₁ в разных вариантах опыления: с применением термообработанной материнской пыльцы (I – влажная камера; II – дистиллированная вода) и путем срезки пестика (Кэ) в комбинации скрещивания Белоснежка х Желтый букет.

нациях, например Белоснежка х Маша и Белоснежка х Карлик, гибридные семена завязывались только в вариантах с криообработкой материнской пыльцы во влажной камере. Это же было отмечено и в процессе работы с другим сортом Карлик, у которого завязываемость гибридных плодов и семян отличалась в разных комбинациях скрещивания

(табл. 3), то есть определялась степень совместимости материнского растения с пыльцой отцовского компонента. У данного сорта несовместимость может проявляться также между отдельными растениями при внутрисортных скрещиваниях [26, 27], что объясняет низкий процент завязывания плодов при традиционном опылении в контрольном варианте (около 10% от общего числа опыленных бутонов). Предварительное нанесение криообработанной собственной пыльцы в данном случае способствовало повышению завязываемости гибридных плодов в 4 раза, а их семенности – почти в 3 раза (табл.3: Карлик х Карлик).

В комбинации скрещивания Карлик х Белоснежка завязываемость гибридных плодов в опытном варианте (I) была на уровне 30%, тогда как в контрольном варианте (Кэ) она также не превышала 10%, даже при полном удалении самоопыленных цветков на материнском растении. Среднее число семян в обоих вариантах было сопоставимо, хотя их посевные качества были несколько выше в контроле. В других комбинациях – с селекционными образцами Л-70, Л-Фех, Л-Мед, число завязавшихся семян в гибридных плодах, полученных на растениях

3. Завязываемость плодов и гибридных семян в комбинациях с сортом Карлик в зависимости от варианта подготовки пыльцы материнского растения и генотипа отцовской формы

Комбинация скрещивания	Вариант опыта: * ♀ пыльцы	Завязываемость плодов, %	Количество семян в плоде		Масса 1000 семян, г	Всхожесть, %
			штук	в т.ч. выполненных, %		
Карлик х Карлик	K _к	10	44±8	95	10,5	100
	I	40	125±23	81	8,0	93
	II	0	-	-	-	-
	HCP ₀₅		10		0,3	
Карлик х Белоснежка	K _к	8	140±44	96	9,7	100
	I	29	140±26	94	8,2	90
	II	0	-	-	-	-
	HCP ₀₅		12		0,5	
Карлик х Л-70	K _к	10	0	-	-	-
	I	17	55±17	96	8,8	70
	II	5	0	-	-	-
Карлик х Л-Фех	K _к	0	-	-	-	-
	I	50	15±11	84	9,1	57
	II	0	-	-	-	-
Карлик х Л-Мед	K _к	20	1±1	0	-	-
	I	33	8±4	98	7,3	100
	II	0	-	-	-	-

* K_к – без нанесения пыльцы материнской формы (контроль); криообработка пыльцы материнской формы 24 часа при -5°C: I – влажная камера, II – водная среда; длительность периода ожидания перед опылением пыльцой отцовской формы 20-30 минут.

сорта Карлик в опытном варианте, было существенно ниже и составило в среднем 8-55 штук.

Дальнейший анализ морфологических признаков растений полученного потомства F₁ подтвердил их гибридную основу во всех комбинациях скрещивания. По показателю «масса плода» гибриды F₁ большинства комбинаций скрещивания превосходили или были на уровне лучшей родительской формы (рис. 5).

Общая продуктивность гибридных растений в комбинации Карлик х Карлик была на уровне средней по сортопопуляции, в комбинации Карлик х Л-Мед имела промежуточные значения относительно родительских компонентов скрещивания, а в комбинациях Карлик х Л-70, Карлик х Л-Фех и Карлик х Белоснежка – существенно превышала их.

Заключение

Вопросы опыления – оплодотворения играют важную роль в практической работе по гибридизации. Особен-

но остро они встают при явлении несовместимости компонентов скрещивания, когда опыление не приводит к завязыванию плодов и получению гибридных семян, несмотря на нормальное развитие генеративных органов растений и благоприятные условия. В последнем случае успех во многом определяется взаимодействием пыльцы отцовского растения с тканями пестика материнской формы [1,2,3].

Предварительное нанесение на рыльце материнского растения собственной криообработанной пыльцы (фертильной, но потерявшей оплодотворяющую способность) инициирует процесс «узнавания» и соответствующие изменения в тканях пестика, что обеспечивает прорастание пыльцевых трубок чужеродной пыльцы, успешное оплодотворение и завязывание гибридных семян у сортов перца сладкого *Capsicum annuum* L. с односторонней несовместимостью.

Использование влажной камеры при криообработке материнской пыльцы является наиболее универсальным способом и может применяться на разных сортах перца сладкого.

Для этого с распустившихся цветков материнского растения собирают пыльцу в пробирки с герметичной крышкой (типа Эппендорф), где условия влажной камеры создают, осторожно помещая в них небольшой ватный тампон, смоченный дистиллированной водой. Подготовленные пробирки ставят в морозильную камеру и выдерживают при температуре -5±2 °C не менее 24 часов. На каждую комбинацию скрещивания готовят отдельную пробирку с материнской пыльцой. Криообработанную материнскую пыльцу осторожно наносят на рыльце заранее кастрированных бутонов того же материнского растения и через 20-40 минут производят его опыление свежесобранной пыльцой отцовского компонента скрещивания (визуальная

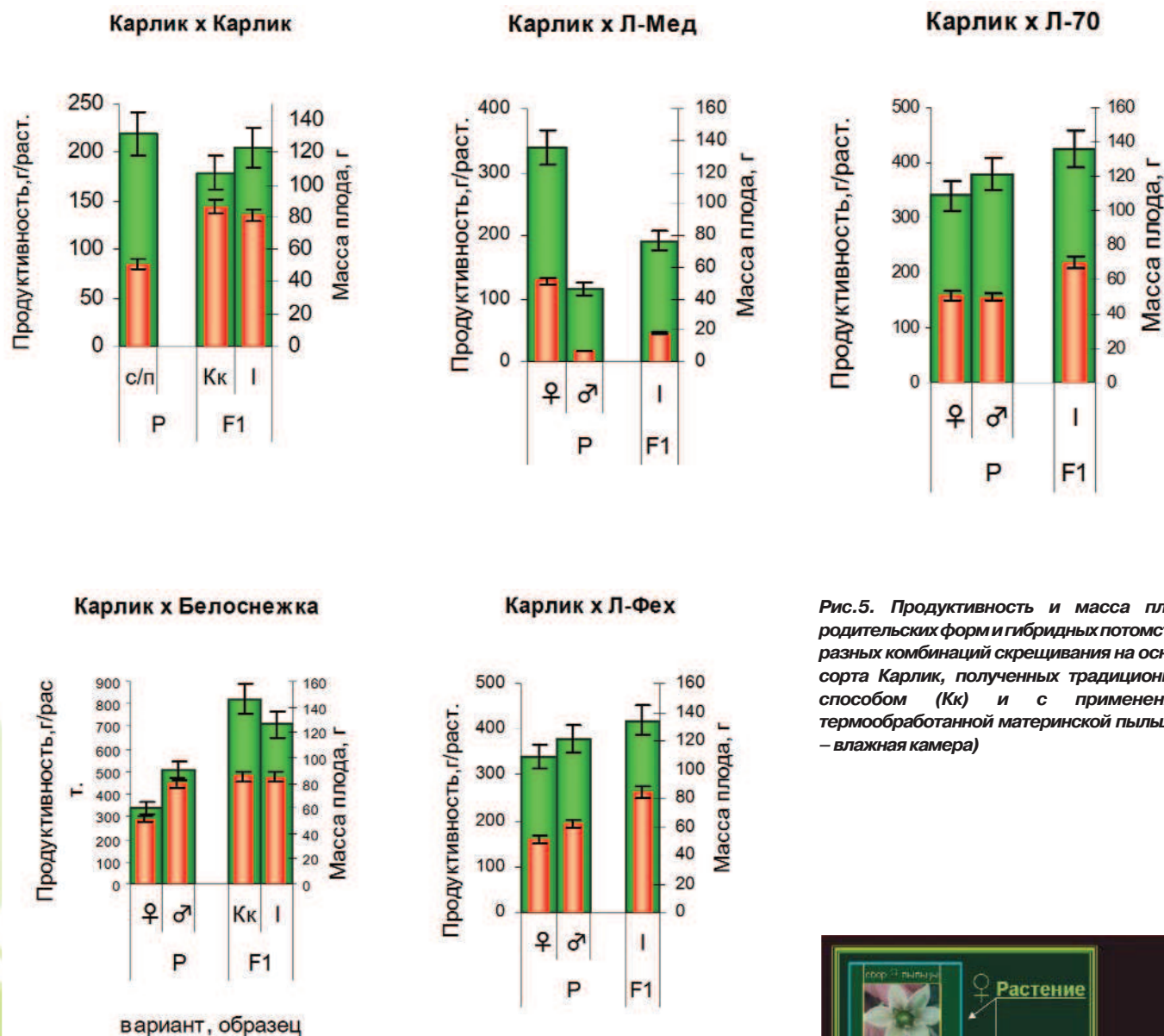


Рис.5. Продуктивность и масса плода родительских форм и гибридных потомств F₁ разных комбинаций скрещивания на основе сорта Карлик, полученных традиционным способом (Кк) и с применением термообработанной материнской пыльцы (I – влажная камера)

схема проведения гибридизации представлена на рисунке 6).

Для повышения завязываемости и осемененности гибридных плодов можно также использовать растворы биологически активных соединений, например стероидных гликозидов в соответствующих концентрациях [43], которые наносят на рыльце непосредственно перед или одновременно с криообработанной материнской пыльцой. Этот прием позволяет дополнительно снизить негативные эффекты реакции несовместимости, холодового стресса и внутренней конкуренции, стимулирует прорастание пыльцевых трубок от-

цовского компонента и процессы оплодотворения, способствует повышению посевных качеств семян и продуктивности гибридных растений. Важно отметить, что к достоинствам разработанной нами методики преодоления односторонней нескрещиваемости сортов перца сладкого Карлик и Белоснежка можно также отнести – простоту ее исполнения, снижение травмирующего действия на пестик цветка перца сладкого во время гибридизации, высокую результативность и воспроизводимость результатов в разных комбинациях скрещиваний и различных условиях.

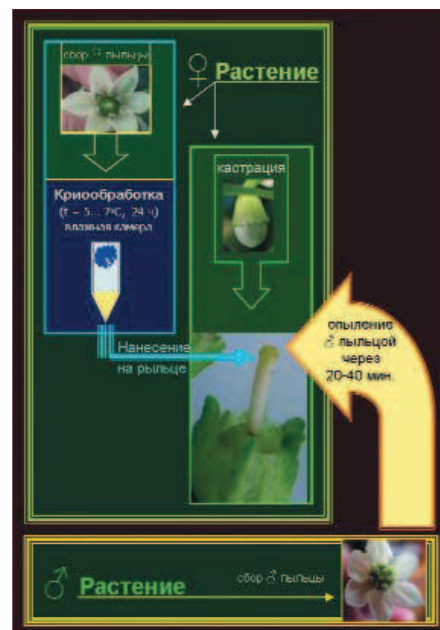


Рис.6. Схема проведения гибридизации на сортах Белоснежка и Карлик (материнская форма) с использованием термообработанной собственной пыльцы для преодоления несовместимости с другими сортами перца сладкого

Литература

1. Johri B.M., Ambegaokar K.B., Srivastava P.S. Comparative Embryology of Angiosperms, Том 1. Springer-Verlag, 1992. -1221 p.
2. Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений. – Москва, 2001.- 391с.
3. Ковалева Л.В., Захарова Е.В. Гаметофитно-спорофитные взаимодействия в системе пыльца – пестик. Гормональный статус и механизм самонесовместимости. Физиология растений. – 2004. - Т. 51.- № 3.- С. 446-451.
4. Суриков И.М. Главные причины нескрещиваемости видов и способы ее преодоления [Обзор] // Сб.науч.тр.по прикл.ботанике, генетике и селекции/ВИР, 1992.- Т.148. – С. 4-12.
5. Игнатова С.И. О межвидовой гибридизации в семействе пасленовых // Докл. сов. учёных к XIX междунар. конф. по садоводству. – 1974. – С. 402-406.
6. Lawrence M.J., Marshall D.F., Curtis V.E., Fearon C.H. Gametophytic self – incompatibility re – examined: a repli. Biological Reviews, 1945.- V. 54.- N. 1.- P. 131-138.
7. Hen-ming Wu, Alice Y. Cheung. Programmed cell death in plant reproduction // Plant Molecular Biology . – 2005. – V.44. – N.3. – P. 267-281.
8. Суриков И.М. Морфологические, генетические и эволюционные аспекты теории внутривидовой и межвидовой половой несовместимости у цветковых растений/ Генетико-селект. аспекты систем размножения энтомофил. видов растений, 1987. -С. 3-20.
9. Батыгина Т.Б. Процесс оплодотворения при отдаленной гибридизации в роде Triticum L. // Ботанический журнал, 1966. – Т. 51.- № 10. – С. 1461-1479.
10. Цингер Н.В., Петровская-Баранова Т.П. Оболочка пыльцевого зерна – живая физиологически активная структура. – ДАН СССР, 1961.- 138 с.
11. Heslop-Harrison J. Pollen walls as adaptive systems. Annals of the Missouri Botanic Garden 1979. – 66: 813-829.
12. Hoekstra FA, Bruinsma J. Protein synthesis of binucleate and trinucleate pollen and its relationship to tube emergence and growth. Planta. -1979. – 559-566 p.
13. Heslop-Harrison Y, Heslop-Harrison J. The digestive glands of Pinguicula: structure and cytochemistry. Ann.Bot. 1981. – 47: 293-319.
14. Линскенс Г.Ф. Реакция торможения при несовместимом опылении и ее преодоление //Физиология растений. 1973. – Т. 20. – Вып. 1. – С. 192-203.
15. Татаринцев А.С. и др. Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур. – М.: Колос, 1981. – 336 с.
16. Курсаков Г.А. Отдаленная гибридизация плодовых растений /ВАСХНИЛ.-: М.: Агропромиздат, 1986. -112 с.
17. Седышева Г.А. О поведении пыльцевых трубок при отдаленных скрещиваниях // Бюл. научн. информ. /ЦГЛ.- Мичуринск, 1969. – В.16. – С. 36-39.
18. Канделаки Г.В. Отдаленная гибридизация и ее закономерности. – Тбилиси: Мецниереба, 1969. – 106 с.
19. Курсаков Г.А., Дубовицкая Л.А. О характере роста пыльцевых трубок при скрещивании разнохромосомных видов сливы // Бюл. научн. инф. /ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1975. – В. 22. – С. 43-47.
20. Курсаков Г.А., Иноземцев В.А. Особенности эмбриогенеза при межвидовой гибридизации яблони (Malus Mill) с грушей (Pyrus Mill) // Тр. / ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1972.- Т 13.-С. 158-163.
21. Кахидзе Н.Т. Изменение элементов зародышевого мешка при оплодотворении у томатов //Изв. АН СССР. Сер. Биологическая.- 1954.-№1.- С. 74-82.
22. Львова И.Н. Некоторые вопросы цитофизиологии оплодотворения у злаков // Селекция и семеноводство. – 1959. – № 9. – С.11-23.
23. Суриков И.М. Несовместимость и эмбриональная стерильность растений/ И. М. Суриков. ВАСНИЛ. – М.: Агропромиздат, 1991. – 220 с.
24. Kafizadeh N., Carapetia J., Kalantari K. M. Effects of Heat Stress on Pollen Viability and Pollen Tube Growth in Pepper // Research Journal of Biological Sciences. – 2008. – V.3. №10. – P. 1159-1162.
25. Бухарова А.Р. Получение исходного материала перца на основе межвидовых скрещиваний: Автореф. дис. канд.с.-х. наук. М., 1995. – 22 с.
26. Джос Е.А. Создание исходного материала перца с использованием отдаленной межвидовой гибридизации: Автореф. дис. канд.с.-х. наук. М., 2009. – 24 с.
27. Бландинская О.А., Козарь Е.Г., Беспалько Л.В., Балашова И.Т. Односторонняя межсортовая несовместимость перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) / Овощи России. М., 2013. – С. 26-29.
28. Бриггс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений. – М.: Колос, 1972. – 397 с.
29. Mercado J., Trigo M., Reid M., Valouesta V., Quesada M. Effects of low temperature on pepper pollen morphology and fertility: evidence of cold induced exine alterations. Journal of Horticultural Science. – 1997. – № 72. – P. 317-326.
30. Li X.G., Meng Q.W., Jiang G.O., Zou Q. The susceptibility of cucumber and sweet pepper to chilling under low irradiance is related to energy dissipation and water-water cycle // Photosynthetica. – 2003. – V.41. – N.2. – P. 259-265.
31. Козарь Е.Г., Беспалько Л.В и др. Влияние условий хранения на жизнеспособность пыльцы перца сладкого // Материалы междунаучно-практ.конф. «Инновационные технологии в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур». Т.2. – М.:ВНИИССОК, 2006. – С. 147-153.
32. Беспалько А.В., Козарь Е.Г., Шмыкова Н.А., Балашова Н.Н. Методические особенности оценки жизнеспособности пыльцы перца сладкого *in vitro*.// Тезисы Международной научно-практической конференции по пасленовым культурам 19-22 августа 2003 г., г. Астрахань, Россия.- С. 45.
33. Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы. – Киев: «Наукова думка», 1974. -370 с.
34. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
35. Данвелл Д.М. Культура гаплоидных клеток // Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. Под ред. Р. Г. Бутенко. М.: Агропромиздат, 1989. – С. 33-51.
36. ГОСТ 12042-80. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян. М.: Издательство стандартов, 1980. – 14 с.
37. Мамедов М.И., Пышная О.Н. Сорты и гетерозисные гибриды перца сладкого, острого и паприки селекции ВНИИССОК для пленочных теплиц и особенности их агротехники // Методические указания. – Москва, 2002. – 45 с.
38. Боос Г.В., Воронина и др. Технология выращивания сладкого перца в защищенном грунте. – М.: Россельхозиздат, 1985. – 19 с.
39. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. -351 с.
40. Щепотьев Ф.Л., Павленко Ф.А. Быстрорастущие древесные породы// М.: Сельхозиздат, 1962. – С.225-234.
41. Knowlton H.E. Studies in pollen with special reference to longevity. – Cornell. Univ. Agr. Exp. St., 1922. – Mem.52. – P.751.
42. Hen-ming Wu, Alice Y. Cheung. Programmed cell death in plant reproduction // Plant Molecular Biology . – 2005. – V.44. – N.3. – P. 267-281.
43. Козарь Е.Г., Бландинская О.А., Балашова И.Т., и др. Использование стероидных гликозидов и термической обработки пыльцы при гибридизации перца сладкого//Межд. научно-практ. конф. Состояние и перспективы научных исследований по картофелеводству, овощеводству и бахчеводству. – Алма-Ата, – 2011. – С. 43-50.