<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-50-54>
УДК 635.64:631.524.01

Салтанович Т.И., Дончилэ А.Н.

Институт генетики, физиологии и защиты растений
Молдова, Кишинев, ул. Падурии, 1, MD 2002
E-mail: tatianasalt@mail.ru

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Салтанович Т.И., Дончилэ А.Н. Идентификация устойчивых генотипов томата с использованием гаметных технологий. *Овощи России*. 2020;(4):50-54.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-50-54>

Поступила в редакцию: 05.05.2020

Принята к печати: 07.07.2020

Опубликована: 25.08.2020

Tatiana I. Saltanovich, Anna N. Doncila

Institute of Genetics,
Physiology and Plant Protection
20, Padurii St., Chisinau, MD-2002,
Republic of Moldova
E-mail: tatianasalt@mail.ru

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For citation: Saltanovich T.I., Doncila A.N. Identification of resistant tomato genotypes using the gamete technologies. *Vegetable crops of Russia*. 2020;(4):50-54. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-50-54>

Received: 05.05.2020

Accepted for publication: 07.07.2020

Accepted: 25.08.2020

Идентификация устойчивых генотипов томата с использованием гаметных технологий

РЕЗЮМЕ

Актуальность. К числу факторов окружающей среды, негативно влияющих на развитие большинства сельскохозяйственных культур, в том числе томата, относятся высокие температуры. В связи с этим, важным условием реализации потенциальной продуктивности растений является наличие термоустойчивости. Методы гаметной селекции в сочетании с классическими подходами могут быть использованы для отбора устойчивых генотипов и создания исходного селекционного материала с устойчивостью к температурному фактору.

Материал и методы. Эксперименты проводили с внутривидовыми гибридами F₄ томата: Elvira x Milenium, Elvira x Tomiş, Elvira x Prestij, Mihaela x Milenium, Mihaela x Tomiş, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Tomiş, Jubiliar x Prestij, Milenium x Elvira, Milenium x Mihaela. Растения выращивали в поле, собирали цветки, отделяли пыльники, выделяли пыльцу. В опыте пыльцу прогревали 2 и 4 часа при 43°C, в контроле пыльца находилась при температуре 26°C; затем проводили посев и проращивание пыльцы на питательной среде, определяли ее жизнеспособность, длину пыльцевых трубок. На стадии спорофита жаростойкость определяли по ростовой реакции проростков.

Результаты. Установлена дифференцированная реакция пыльцевых зерен на температурное воздействие. Определены основные источники изменчивости и их вклад в вариабельность признаков пыльцы и проростков. Температура и генотип детерминируют большую часть изменчивости гаметофита и спорофита. Более половины гибридов сочетали высокие показатели устойчивости как пыльцы, так и проростков, формировали большее число цветков и лучше завязывали плоды. Таким образом, на основе сочетания методов оценки устойчивости гибридов по гаметофиту и спорофиту, а также генетико-статистического анализа, идентифицированы жаростойкие генотипы томата с хорошими показателями устойчивости для использования в селекции. Кроме того, использованный подход может быть рекомендован для прогноза реакции генотипов на действие температуры.

Ключевые слова: томат, пыльца, температура, изменчивость.

Identification of resistant tomato genotypes using the gamete technologies

ABSTRACT

Relevance. High temperatures are among the environmental factors that negatively affect the development of most crops including tomatoes. Thus, important condition for the realization of potential plant productivity is the heat resistance. Methods of the gamete selection in combination with classical approaches can be used to select resistant genotypes and create initial breeding material with resistance to the temperature factor.

Materials and methods. The experiments were carried out with intraspecific hybrids F₄ of tomato: Elvira x Milenium, Elvira x Tomiş, Elvira x Prestij, Mihaela x Milenium, Mihaela x Tomiş, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Tomiş, Jubiliar x Prestij, Milenium x Elvira, Milenium x Mihaela. Plants were grown in the field. Flowers were collected, anthers were separated, pollen was isolated. Pollen was heated for 2 or 4 hours at 43°C in the experimental variants. In the control, pollen was maintained at a temperature of 26°C. Then pollen was sown and germinated on a cultural medium. The viability was determined by the length of pollen tubes.

Results. A different reaction of pollen grains to temperature influence was established. The main sources of variability and their contribution to the variability of the pollen and seedling traits were determined. The temperature and genotype mainly determine the variability of the gametophyte and sporophyte. More than half of the hybrids combined high indicators of resistance of both pollen and seedlings, formed a larger number of flowers and better set fruits. Thus, tomato genotypes with good indicators of heat-resistance for applying in breeding have been identified based on a complex of methods for assessing the resistance of hybrids using gametophyte and sporophyte characteristics, as well as results of genetic-statistical analysis.

Keywords: tomato, pollen, temperature, variability.

Введение

В настоящее время цель большинства селекционных программ ориентирована на улучшение показателей, способствующих повышению экономической ценности сельскохозяйственных культур. К числу таких характеристик могут быть отнесены признаки урожайности, устойчивости к абиотическим стрессам, патогенам, вредителям и др. Исходя из того, что в результате климатических воздействий на разных этапах вегетации, в том числе и на репродуктивных, растения оказываются в сложных стрессовых условиях, большинство из них способно реализовать лишь незначительную часть генетического потенциала продуктивности. В связи с этим, селекция на устойчивость к неблагоприятным условиям среды требует постоянной работы над поиском новых устойчивых генотипов, а также закрепления генов устойчивости в генотипе сорта или гибрида. По мнению некоторых авторов скрининг растений устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам является одной из главных селекционных задач [1, 2].

Известно, что характер генетической детерминации и наследования признаков стрессоустойчивости растений к действию абиотических факторов зависит от многих генов и всего генома в целом, а реализация их активности наблюдается только в условиях действия стрессовых факторов [3]. Поэтому для селекционеров значительный интерес могут представлять результаты исследований по прогнозу реакции различных генотипов на действие условий внешней среды. Создание растений с большей термо- и засухоустойчивостью возможно, так как толерантность генотипов к этим факторам наследственно детерминирована. В то же время для повышения эффективности скрининга устойчивых генотипов целесообразно применять сочетание классических селекционных технологий и нетрадиционных экспресс-методов, позволяющих оценивать устойчивость популяций. Успешная реализация таких задач напрямую зависима от эффективности применяемых подходов. В этом плане методы пылевой селекции могут быть успешно использованы для характеристики генотипов по устойчивости к абиотическим стрессам, токсическим продуктам, патогенам, устойчивости к болезням и прогноза реакции генотипов на стрессовые воздействия. На основании анализа изученных характеристик, как пыльцы, так и спорофита, возникает возможность создания исходного селекционного материала с устойчивостью к определенному стрессовому воздействию. Известны результаты ряда исследований, подтверждающие эффективность отбора устойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении, а также о возможном его практическом использовании в качестве инструмента в селекционных программах [4-7]. Полученная информация свидетельствует о реальной возможности использования вариативности признаков мужского гаметофита в селекционных программах для оценки и отбора устойчивых генотипов в условиях абиотических стрессов. Учитывая то, что проблема создания нового исходного материала для селекции всегда актуальна, цель проведенных исследований состояла в идентификации устойчивых генотипов томата на основе использования гаметных технологий и выявления ключевых факторов, детерминирующих изменчивость гаметофита и спорофита в условиях высоких температур.

Материал и методы

Для проведения экспериментов использовали набор внутривидовых гибридов F₄ томата следующих

комбинаций скрещивания: Elvira x Milenium, Elvira x Tomiş, Elvira x Prestij, Mihaela x Milenium, Mihaela x Tomiş, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Tomiş, Jubiliar x Prestij, Milenium x Elvira, Milenium x Mihaela.

Эксперименты проводили как в полевых, так и в лабораторных условиях. Растения выращивали в поле по общепринятой для томата методике до стадии цветения, собирали полностью раскрытые цветки, отделяли пыльники и подсушивали их при оптимальной температуре. Часть выделенной пыльцы помещали в термостат и прогревали при температуре 43°C в течение 2-х и 4-х часов (опыт), пыльца контрольного варианта находилась в термостате при оптимальном температурном режиме 26°C. По истечении указанного времени пыльцу высевали для проращивания в искусственную питательную среду. Стекла с посевами помещали в чашки Петри на слой влажной фильтровальной бумаги, культивирование проводили в течение 3-х часов в термостате при постоянной температуре 28°C. Анализировали препараты под микроскопом, при этом подсчитывали число проросших и непроросших пылевых зерен (не менее 500 штук) по каждому генотипу в контрольном и опытном вариантах; определяли жизнеспособность пыльцы по соотношению проросших ко всем подсчитанным пылевым зернам в процентах. Кроме того, измеряли длину пылевых трубок (ПТ) в условных единицах деления окуляр-микрометра, определяли среднее значение признака – $\bar{X}$ средн. и ошибку Sx средн..

На основании полученных результатов вычисляли

а) устойчивость пыльцы, как соотношение показателей жизнеспособности в опыте к контролю в процентах; б) устойчивость ПТ, как соотношение средней длины ПТ в опыте к контролю в процентах.

Оценку жаростойкости генотипов проводили по ростовой реакции проростков после прогревания их при высокой температуре [8].

Дальнейшую статистическую обработку полученных результатов проводили методами суммарной статистики и дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программ Statgraphics v.5.1 и Excel 2016.

Результаты и их обсуждение

Условия внешней среды, особенно температура, оказывают существенное влияние на качество мужского гаметофита. Установлено, что пылевые зерна изученных генотипов характеризуются неодинаковой термочувствительностью. Результаты наших исследований показали, что в большинстве случаев действие повышенной температуры приводило к снижению средних значений жизнеспособности пыльцы в 1,2-1,7 раза в зависимости от экспозиции прогревания и уменьшении длины пылевых трубок в 1,3-1.5 раз (рис. 1). Следует отметить, что по сравнению с результатами 2018 года, изменчивость этих признаков была более слабой, что может свидетельствовать о более стабильной реакции пыльцы на температурное воздействие, и определяться результатами ранее проведенных циклов пылевой селекции.

Как было указано ранее, реакция генотипов была дифференцированной. Результаты исследований показали увеличение жизнеспособности пыльцы у 3-х генотипов в результате 2-х часового прогревания пыльцы, что может быть связано с процессом созревания пылевых зерен в этих условиях. В то же время, у большинства генотипов температурное воздействие на пыльцу вызывало снижение ее жизнеспособности. Параллельно с увеличением экспозиции

Рис. 1. Влияние температуры на изменчивость жизнеспособности пыльцы (А) и длины пыльцевых трубок (Б), 2017-2019 годы

Fig. 1. The effect of temperature on the variability of pollen viability (A) and tube lengths (B), 2017-2019

прогревания у половины изученных генотипов значения этого признака снизились на 3,0-13,2%. Анализ гистограмм распределения пыльцевых зерен по признаку длина пыльцевой трубки на температурном фоне и экспозиции 4 часа показал уменьшение размаха изменчивости по сравнению с контрольным вариантом, что может быть связано с более низкой скоростью роста пыльцевых трубок в этих условиях.

Для выявления основных источников варьирования признаков мужского гаметофита был применен метод дисперсионного анализа (ANOVA), результаты статистической обработки обнаружили достоверный вклад ($P < 0,05$) генотипа, температуры и их взаимодействия. Так, изменчивость жизнеспособности пыльцы детерминирована генотипом (32,1%), температурой (51,5%) и их взаимодействием (17,0%).

При изучении структуры спектра изменчивости признака длина пыльцевых трубок было показано, что большую часть вариабельности определяет генотип – 49,3%, вклад температурного фактора составляет 40,5%, в то же время сила взаимодействия этих факторов гораздо более слабая и равна 11,0% (рис.2). Таким образом, температурный фактор и генотип являются ключевыми факторами, вызывающими вариабельность качества мужского гаметофита после прогревания пыльцевых зерен.

Анализ статистической обработки экспериментальных данных показал, что большинство исследуемых

генотипов обнаружили довольно высокий уровень устойчивости пыльцы, который варьировал в пределах 57,0-93,7%, и только у 4-х комбинаций устойчивость пыльцы была более низкой и изменялась от 32,0 до 45,3%. В то же время, при изучении реакции длины пыльцевых трубок на действие температуры установлено, что все гибриды, за исключением одной комбинации (F₄ Jubiliar x Tomiş), обнаружили уровень устойчивости, превышающий 50,0%. Таким образом, изученные генотипы томата различаются по устойчивости микрогаметофитов к повышенной температуре, на это указывают как различия по проценту прорастания пыльцевых зерен, так и по скорости роста пыльцевых трубок. Кроме того, в ряде случаев отмечено, что высокая устойчивость пыльцы сочетается с высокой скоростью роста пыльцевых трубок. Полученные результаты позволили отселектировать 5 гибридных комбинаций (F₄ Elvira x Milenium, Elvira x Prestij, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Prestij), которые сочетали высокий уровень устойчивости пыльцы и пыльцевых трубок. Среди изученных генотипов только у одного гибрида (F₄ Jubiliar x Tomiş) показатели устойчивости были невысокими, что, вероятно, может быть связано с чувствительности пыльцевых зерен этого генотипа к температуре (табл.).

Параллельно с оценкой устойчивости мужского гаметофита была изучена реакция этих же гибридных

Рис.2. Основные источники изменчивости признаков мужского гаметофита, 2017-2019 годы

Fig. 2. The main sources of variation in the characteristics of male gametophyte, 2017-2019

Таблица. Устойчивость гибридов томата по признаку мужского гаметофита. 2017-2019 годы
Table. The resistance of tomato hybrids by traits of a male gametophyte. 2017-2019.
признакам мужского гаметофита. 2017-2019 годы

Гибриды F ₄	Устойчивость пыльцы, %	Устойчивость ПТ, %
Elvira x Milenium	93.7	91.2
Elvira x Tomi	45.3	72.4
Elvira x Prestij	76.6	60.2
Mihaela x Milenium	42.8	70.3
Mihaela x Tomi	38.1	50.5
Mihaela x Prestij	83.1	79.5
Jubiliar x Milenium	93.2	57.8
Jubiliar x Tomi	32.0	31.6
Jubiliar x Prestij	84.1	53.4
Milenium x Elvira	64.5	55.8
Milenium x Mihaela	57.0	64.9
HCP _{0,5}	1,85	2,0

комбинаций на действие высокой температуры на этапе прорастания семян по ростовой реакции проростков. Результаты эксперимента показали, что все исследуемые генотипы при оптимальных условиях характеризовались довольно высоким уровнем прорастания семян, который варьировал в пределах 77,5-97,5% в зависимости от генотипа.

Установлено, что как в контроле, так и опыте, средние значения длины проростков при первом измерении составляли 6-15 мм. В результате второго измерения в контроле отмечено увеличение размеров проростка в 3,5-6,8 раза, при этом у 4 гибридных комбинаций значения этого признака возрастали более чем в 6,0 раз. Одновременно показано, что в опытном варианте (после воздействия температуры) длина проростков увеличивалась меньше (в 2,6-5,0 раз), при этом только у одного гибрида был выявлен прирост длины проростка в 5,0 раз. Таким образом, в опытном варианте (после прогревания проростков) происходит значительное уменьшение скорости их роста. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали достоверность влияния ($P < 0,05$) генотипа (10,4%), температуры (80,4%) и их взаимодействия (8,0%) на изменчивость длины проростков.

Анализ распределения по признаку длина проростка после прогревания показал, что у генотипов с более высоким значением уровня устойчивости проростков

Рис. 3. Распределение по длине проростка у генотипов с разным уровнем устойчивости, 2017-2019 годы
Fig. 3. The distribution of genotypes with different levels of resistance according to the length of the seedling, 2017-2019

Рис. 4. Устойчивость к повышенной температуре гаметофита и спорофита томата, 2018-2019 годы
Fig. 4. Resistance to elevated temperature of the tomato gametophyte and sporophyte, 2018-2019

(F4 Mihaela x Prestij) диапазон спектра изменчивости по этому признаку расширен, тогда как у генотипов с более низкими показателями устойчивости (F4 Elvira x Milenium) отмечен более узкий спектр вариабельности этого признака (рис.3). По нашему мнению, более высокий уровень устойчивости у гибрида F4 Mihaela x Prestij определяется увеличением частоты формирования более длинных проростков по сравнению с F4 Elvira x Milenium.

На основе обобщения полученных данных мы провели сравнение устойчивости генотипов на стадиях гаметофита и спорофита. Полученные результаты показали, что гибридные комбинации F4 Elvira x Milenium, Elvira x Prestij, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Prestij, Milenium x Elvira проявили высокие показатели устойчивости мужского гаметофита и проростков после их прогревания при высокой температуре. Таким образом, более половины изученных генотипов сочетали высокие показатели устойчивости как пыльцы, так и семян (рис.4). Кроме того, проведенный в полевых условиях анализ элементов продуктивности показал, что эти гибридные комбинации формировали большее число цветков и характеризовались более высоким процентом завязывания плодов, что, вероятно, может свидетельствовать о перспективе их дальнейшего использования в процессе селекции.

Одновременно были отмечены 3 гибридные комбинации (F4 Mihaela x Milenium, Mihaela x Tomis и Jubiliar x Tomis), которые обнаружили высокий уровень устойчивости на стадии спорофита, тогда как их гаметофит был более чувствителен к температурному влиянию, что может указывать на неодинаковые реакции гаметофита и спорофита на действие температуры в отдельных случаях (рис.4).

Выводы

На основе сочетания методов оценки устойчивости гибридов по признакам гаметофита и спорофита, а также генетико-статистического анализа, идентифицированы 6 жаростойких гибридов томата (F4 Elvira x Milenium, Elvira x Prestij, Mihaela x Prestij, Jubiliar x Milenium, Jubiliar x Prestij, Milenium x Elvira), которые проявили высокие показатели устойчивости на стадиях гаметофита и спорофита и рекомендуются для дальнейшего использования в селекции. Кроме того, для ускорения темпов селекции такой подход может быть эффективно использован с целью прогноза реакции генотипов на действие температурного фактора; для создания сортов с учетом реакций генотипов на этапе мужского гаметофита, а также для более полной реализации генетического потенциала генотипов по результатам анализа компонентов изменчивости признаков.

Об авторах:

Салтанович Татьяна Исаевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Дончилэ Анна Николаевна – научный сотрудник

About the authors:

Tatiana I. Saltanovich – Doc. Sci. (Biology),
Leading Researcher
Anna N. Doncila – Researcher

Литература

1. Гончарова Ю.К. Наследование признака «устойчивость к высоким температурам» у риса. *Вестник ВОГИС*. 2010;14(4):14-18.
2. Кильчевский А.В., Антропенко Н.Ю., Пугачева И.Г. Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства овощных культур. М.: ВНИИССОК. 2005;(2):150-152.
3. Авдеев А.Ю. Селекция и испытание сортов томатов для индивидуальных и коллективных хозяйств Нижнего Поволжья. автореф. канд. с.-х. н. Астрахань. 2006. 20 с.
4. Тоцкий И.А., Лях В.А. Гаметофитный отбор на жаростойкость у подсолнечника культурного. *Вестник ДНУ. сер.А: Природні науки*. 2014;(2):156-160.
5. Юрлова Е.В. Оценка томатов на устойчивость к нерегулируемым абиотическим факторам. *Сиб.Вестник с.-х. наук*. 2006;(2):27-36.
6. Katalin Jäger, Attila Fábián, Beáta Barnabás. Effect of water deficit and elevated temperature on pollen development of drought sensitive and tolerant winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008.;52(1):67-71.
7. Georgios C. Koubouris, Ioannis T. et al. Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany*. 2009;67(1):209-214.
8. Ивакин А.П. Определение жаростойкости овощных культур по ростовой реакции проростков после прогревания. *Физиология растений*. 1981;28(2):444-447.

References

1. Goncharova Yu.K. Inheritance of the "resistance to high temperatures" trait in rice. *VOGIS Bulletin*. 2010;14(4):14-18. (In Russ.)
2. Kilchevsky A.V., Antropenko N.Yu., Pugacheva I.G. Current status and prospects for the development of breeding and seed production of vegetable crops. M.: VNISSOK. 2005;(2):150-152. (In Russ.)
3. Avdeev A.Yu. Breeding and testing of tomato varieties for individual and collective farms of the Lower Volga. autoref. cand. agricultural science. Astrakhan. 2006. 20 p. (In Russ.)
4. Totsky I.A., Lyakh V.A. Gametophyte selection for heat resistance in cultured sunflower. *Vestnik of DNU. ser.A: Natural science*. 2014;(2):156-160. (In Russ.)
5. Yurlova E.V. Assessing tomatoes for resistance to unregulated abiotic factors. *Sib. Vestnik agr. science*. 2006;(2):27-36. (In Russ.)
6. Katalin Jäger, Attila Fábián, Beáta Barnabás. Effect of water deficit and elevated temperature on pollen development of drought sensitive and tolerant winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008.;52(1):67-71.
7. Georgios C. Koubouris, Ioannis T. et al. Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany*. 2009;67(1):209-214.
8. Ivakin A.P. Determination of heat resistance of vegetable crops by the growth reaction of seedlings after heating. *Plant Physiology*. 1981;28(2):444-447. (In Russ.)