

Научная статья

УДК 633.854.78:575

DOI: 10.25230/2412-608X-2022-1-189-11-15

Оценка фертильности пыльцы гибридов подсолнечника методом сплит-опыления

Яков Николаевич Демури
Ольга Александровна Рубанова
Юлия Владимировна Чебанова
Наталья Владимировна Каменева

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
genetic@vniimk.ru

Ключевые слова: подсолнечник, гибрид, фертильность, пыльца, опыление, завязываемость семян

Для цитирования: Демури Я.Н., Рубанова О.А., Чебанова Ю.В., Каменева Н.В. Оценка фертильности пыльцы гибридов подсолнечника методом сплит-опыления // Масличные культуры. 2022. Вып. 1 (189). С. 11–15.

Аннотация. Основная задача исследования заключалась в изучении влияния пыльцы гибридов подсолнечника на реальную семенную продуктивность и завязываемость семян у растений ЦМС-тестера как финальные показатели фертильности пыльцы. Исследования проводили в 2019 и 2021 гг. на ЦЭБ ВНИИМК, г. Краснодар. Объектом исследования были растения культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L.: гибриды Окси и НК Брио как отцовские формы, а также стерильный гибрид Кубанский 93 и линия VK1-кп А как ЦМС-тестеры. На одну вертикальную часть отдельной корзинки наносили пыльцу гибрида Окси, а на другую – гибрида НК Брио, т.е. использовали метод сплит-опыления. Количество выполненных семян на корзинках ЦМС-тестера при опылении пыльцой гибрида Окси было значительно меньше, чем у стандартного гибрида НК Брио. В среднем за два года наблюдали уменьшение реальной семенной продуктивности у гибрида Окси в 1,97 раза по отношению к гибриду НК Брио. Развитие большего числа семян к технической спелости приводило к прогрессивному разрастанию части корзинки, опыленной пыльцой гибрида НК Брио. Аналогичная закономерность отмечена также по завязываемости семян. На

корзинках ЦМС-тестера в среднем за два года пыльца гибрида Окси показала значительное снижение завязываемости семян по отношению к стандарту – в 2,24 раза. Полученные нами ранее результаты о наличии у пыльцы гибрида подсолнечника Окси морфологических аномалий согласуются с установленными в данной работе фактами сниженной семенной продуктивности и завязываемости семян при оценке качества пыльцы этого гибрида в скрещивании с ЦМС-тестером. Остается открытым вопрос о том, на каких этапах происходит негативное воздействие генетических факторов репродуктивной функции пыльцы гибрида Окси: пре- или пост-зиготическом.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № Н-21.1/8.

UDC 633.854.78:575

Evaluation of pollen fertility of sunflower hybrids by the method of split-pollination.

Ya.N. Demurin, head of a lab., chief researcher, doctor of biology

O.A. Rubanova, junior researcher, PhD in biology

Yu.V. Chebanova, senior researcher, PhD in biology

N.V. Kameneva, post-graduate student

Keywords: sunflower, hybrid, fertility, pollen, pollination, seed set

Abstract. The main objective of the study was to study the effect of pollen from sunflower hybrids on the real seed productivity and setting of achenes in CMS-tester plants as the final indicators of pollen fertility. The studies were carried out in 2019 and 2021 at V.S. Pusotvoit All-Russian Research Institute of Oil Crops, Krasnodar. The object of the study was cultivated sunflower plants of *Helianthus annuus* L.: Oksi and NK Brio hybrids as paternal forms, as well as the sterile hybrid Kubansky 93 and the line VK1-klp A as CMS testers. On one vertical part of a separate head, the pollen of the Oksi hybrid was applied, and on the other, the pollen of the NK Brio hybrid was used, i.e. we applied the split-pollination method. The number of filled seeds on the head of the CMS tester when pollinated with the pollen of the hybrid Oksi was significantly less than that of the standard hybrid NK Brio. On average, over two years, a decrease in real seed productivity was observed in the hybrid Oksi by 1.97 times in relation to the hybrid NK Brio. The development of a larger number of achenes to technical maturity led to the progressive growth of a part of the head pollinated by the pollen of the NK Brio hybrid. A similar pattern was also noted for the seed set. On the heads of the CMS-

tester, on average for two years, the pollen of the hybrid Oksi showed a significant decrease in the setting of achenes in relation to the standard – by 2.24 times. Our earlier data on the presence of morphological anomalies in the pollen of the Oksi sunflower hybrid are consistent with the facts of reduced seed productivity and seed set when evaluating the pollen quality of this hybrid crossed with the CMS-tester, established in this work. The question remains open at what stages the negative impact of the genetic factors of the reproductive function of the pollen of the Oksi hybrid occurs: pre- or post-zygotic.

Acknowledgements. The research was carried out with the financial support of the Kuban Science Foundation as a part of the scientific project № N-21.1/8.

Введение. Показатели потенциальной и реальной семенной продуктивности сельскохозяйственных растений тесно связаны с качеством пыльцы. В научной литературе к качеству пыльцевых зёрен широко применяют такие термины, как «жизнеспособность», «фертильность» и «пыльцевые зёрна нормальной морфологии» [1; 2; 3].

К фертильным относят зрелые пыльцевые зёрна, без морфологических аномалий и способные к оплодотворению. Определяют фертильность методами окрашивания: ацетокарминовым, ацетоорсеиновым, йодным и др. [1; 2].

К жизнеспособным относят фертильные пыльцевые зёрна, способные к формированию пыльцевых трубок. Жизнеспособность пыльцы чаще всего определяют методом проращивания пыльцевых зёрен на искусственной питательной среде, включая раствор сахарозы с добавлением агар-агара [2].

Пыльцу подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus* L.) сложно культивировать *in vitro*. На простых средах отмечен плохой рост пыльцевой трубки. Однако Murthy et al. сообщают о питательной среде для подсолнечника, в которой отмечено интенсивное прорастание пыльцы до 91,5 % [4]. Авторами Atlagic et al. предложен метод флуоресцентной микроскопии, адаптированный для пыльцы подсолнечника. С помощью данного ме-

тода можно отслеживать прорастание пыльцевых зёрен на рыльце и рост пыльцевой трубки через пестик к яйцеклетке [5].

Пыльцевые зёрна считают проросшими если пыльцевая трубка равна или больше диаметра пыльцевого зерна. Процент проросших пыльцевых зёрен определяют как количество проросших к общему числу пыльцевых зёрен умноженному на 100 [6].

Процент жизнеспособных пыльцевых зёрен зависит от генотипа и факторов окружающей среды [7]. Высокая температура во время цветения подсолнечника может замедлять рост пыльцевой трубки [8]. Жизнеспособность пыльцы снижает экстракт полыни при добавлении его в питательную среду, поэтому такой экстракт возможно использовать для обработки агрономически нежелательных растений дикорастущего подсолнечника во время цветения для образования пыльцы с низкой жизнеспособностью [9].

Для гибрида подсолнечника Окси с наследственно изменённым качеством масла в семенах отмечена значительная морфологическая гетерогенность пыльцы, которая выражалась в высокой доле аномальных пыльцевых зёрен (до 26 %), что предположительно может снижать фертильность пыльцы [10]. Поэтому нами была поставлена задача изучить влияние пыльцы этого гибрида на реальную семенную продуктивность и завязываемость семян у растений ЦМС-тестера как финальные показатели качества пыльцы.

Материалы и методы. Исследования проводили в 2019 и 2021 гг. на ЦЭБ ВНИИМК, г. Краснодар. Объектом исследования были растения культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L.: гибриды Окси и НК Брио как отцовская форма, а также стерильный гибрид Кубанский 93 и линия ВК1-кльп А как материнская форма, т.е. ЦМС-тестер.

Гибрид подсолнечника НК Брио был выбран в качестве стандарта высокой репродуктивной способности [10].

В 2019 г. растения гибридов выращивали на четырёхрядных делянках при

схеме посева 70×23 см (60 тыс. шт./га) на селекционном поле в посеве конкурсного сортоиспытания лаборатории селекции гибридного подсолнечника. Растения стерильного гибрида Кубанский 93 выращивали на двурядковой делянке, при схеме посева 70×35 см (40 тыс. шт./га) в полевом питомнике этой лаборатории.

В 2021 г. растения гибридов Окси и НК Брио выращивали на однорядковых делянках, а растения стерильной линии ВК1-клп А – на двурядковой делянке, при схеме посева 70×35 см на селекционном поле лаборатории генетики.

Для прямого метода определения фертильности (оплодотворяющей способности) пыльцы, приводящей к развитию семян, на разделённые вертикально пополам изолированные корзинки ЦМС-гибрида Кубанский 93 (2019 г., 9 растений) и ЦМС-линии ВК1-клп (2021 г., 8 растений), начиная с четвёртого дня цветения корзинки, в течение трёх дней подряд наносили пыльцу разных генотипов. При этом для принудительного опыления использовали смесь собранной пыльцы с пяти корзинок каждой отцовской формы, предварительно изолированных индивидуальными изоляторами из агроспанбонда. На левую часть отдельной корзинки наносили пыльцу гибрида Окси, а на правую – гибрида НК Брио, т.е. использовали метод отдельного или сплит-опыления.

После созревания корзинок их срезали и в лабораторных условиях обмолачивали индивидуально каждую половину. Завязываемость семян определяли как отношение количества выполненных семян в изучаемой половине корзинки к общему числу семян в этой половине корзинки, т.е. сумме выполненных и невыполненных.

Результаты и обсуждение. Опыление разной пыльцой двух половин нормально цветущей отдельной корзинки ЦМС-тестера позволяет провести максимально точное сравнение качества пыльцы двух генотипов с учётом принципа единственного различия в монофакториальном опыте. А именно: в левой и правой вертикально разделённых половинах находят-

ся: одинаковое число опыляемых трубчатых цветков, одинаковые трофические возможности цветоложа в снабжении питательными веществами и одинаковые условия микроклимата под одним изолятором (рис. а, б). Следовательно, создаются все условия для реализации именно различий по качеству наносимой пыльцы, которое в случае одинаковых условий при сборе пыльцы с растений-опылителей будет носить очевидно генотипический характер.

В случае использования целых корзинок ЦМС-тестера для сравниваемых образцов пыльцы и получения сопоставимых результатов потребуется большее количество опыляемых корзинок в каждом варианте эксперимента для устранения влияния потенциальных модификационных различий.

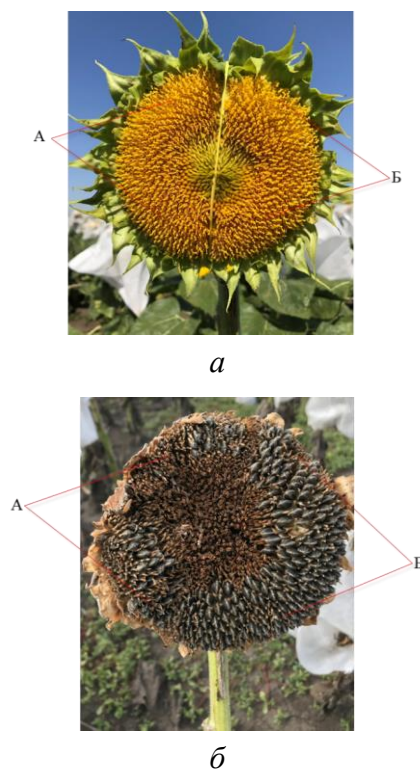


Рисунок – Сплит-опыление корзинки линии ВК1-клп А
(а – цветение, б – созревание).
А – зона нанесения пыльцы гибрида Окси; Б – гибрида НК Брио

Количество выполненных семян на корзинках ЦМС-тестера при опылении

пыльцой гибрида Окси было достоверно и значительно меньше, чем у стандартного гибрида НК Брио в каждом году испытаний (табл. 1). В среднем за два года наблюдали уменьшение реальной семенной продуктивности у гибрида Окси – в 1,97 раза по отношению к гибриду НК Брио (190 против 374 шт. на половину корзинки). Развитие большего числа семян к технической спелости приводило к прогрессивному разрастанию правой части корзинки, опылённой пыльцой гибрида НК Брио (рис., б).

Таблица 1

Семенная продуктивность у корзинок ЦМС-тестера при сплит-опылении пыльцой гибридов подсолнечника

г. Краснодар, ЦЭБ ВНИИМК, 2019, 2021 гг.

Генотип	Количество выполненных семян в половине корзинки, шт.		Среднее за 2 года, шт.
	2019 г.	2021 г.	
Окси	316	63	190
НК Брио	523	224	374
НСР ₀₅	35	81	

Аналогичная закономерность отмечена также по завязываемости семян (табл. 2). На корзинках ЦМС-тестера в среднем за два года пыльца гибрида Окси показала достоверное и значительное снижение завязываемости семян по отношению к стандарту – в 2,24 раза (33 и 74 %, соответственно).

Таблица 2

Завязываемость семян у корзинок ЦМС-тестера при сплит-опылении пыльцой гибридов подсолнечника

г. Краснодар, ЦЭБ ВНИИМК, 2019, 2021 гг.

Генотип	Завязываемость семян, %		Среднее за 2 года, %
	2019 г.	2021 г.	
Окси	44	22	33
НК Брио	69	78	74
НСР ₀₅	12	10	

Таким образом, полученные нами ранее результаты о наличии у пыльцы гибрида подсолнечника Окси морфологических аномалий [10] очевидно согласу-

ются с установленными в данной работе фактами сниженной семенной продуктивности и завязываемости семян при оценке качества пыльцы этого гибрида в скрещивании с ЦМС-тестером.

Остаётся открытым вопрос о том, на каких этапах происходит негативное воздействие генетических факторов репродуктивной функции пыльцы гибрида Окси: пре- или пост-зиготическом.

Выводы. Количество выполненных семян в корзинках ЦМС-тестера при опылении пыльцой гибрида Окси было значительно меньше, чем у стандартного гибрида НК Брио. В среднем за два года наблюдали уменьшение реальной семенной продуктивности у гибрида Окси – в 1,97 раза по отношению к гибриду НК Брио. Развитие большего числа семян к технической спелости приводило к прогрессивному разрастанию части корзинки, опылённой пыльцой гибрида НК Брио. Аналогичная закономерность отмечена также по завязываемости семян. На корзинках ЦМС-тестера в среднем за два года при опылении пыльцой гибрида Окси наблюдалось значительное снижение завязываемости семян по отношению к стандарту – в 2,24 раза.

Список литературы

1. Цаценко Л.В., Логвинов А.В. Пыльцевой анализ растений в селекционной практике: монография. – Краснодар: Просвещение-Юг, 2021. – 101 с.
2. Круглова Н.Н. Оценка качества пыльцевых зёрен цветковых растений (обзор) // Бюллетень ГНБС. – 2020. – Вып. 135. – С. 50–56.
3. Воронова О.Н., Гаврилова В.А. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus L.*) и его использование в селекционной работе // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Вып. 180 (1). – С. 95–104.
4. Murthy M.N.K., Reddy Y.A.N., Virupakshappa K. Development of suitable germination medium for trinucleate pollen grains: an illustration with sunflower // Oilseeds Research. – 1994. – Vol. 11 (2). – P. 304–307.

5. Atlagic J., Terzic S., Marjanovic-Jeromela A. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species // *Industrial Crops and Products*. – 2012. – Vol. 35. – P. 88–91.

6. Todorova M., Nenova N., Encheva J. Study on in vitro pollen germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.) before and after gamma-irradiation // *Bulg. J. Agric. Sci.* – 2004. – Vol. 10. – P. 65–70.

7. Humera Razzaq, Shamsa Kanwal, Muhammad Hammad Nadeem Tahir, Bushra Sadia Effects of spring and autumn seasons on the variability among sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions for pollen viability, germination and morphology // *International Journal of Scientific, Engineering Research*. – 2015. – Vol. 6 (1). – P. 2035–2044.

8. Astiz V., Hernandez L.F. Pollen production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is affected by air temperature and relative humidity during early reproductive growth // *Int. J. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 82. – P. 297–302.

9. Del Pino A.M., Pannacci E., Di Michele A., Bravi, E., Marconi O., Tei F., Palmerini C.A. Selective Inhibition of wild sunflower reproduction with mugwort aqueous extract, tested on cytosolic Ca²⁺ and germination of the pollen grains // *Plants*. – 2021. – Vol. 10 (7). – P. 1364. [https://DOI: 10.3390/plants10071364](https://doi.org/10.3390/plants10071364).

10. Демури́н Я.Н., Рубанова О.А. Пыльцевой анализ растений различных генотипов подсолнечника // *Масличные культуры*. – 2021. – Вып. 2 (186). – С. 10–17. DOI: 10.25230/2412-608X-2021-2-186-10-17.

References

1. Tsatsenko L.V., Logvinov A.V. Pyltsevoy analiz rasteniy v selektsionnoy praktike // *Monografiya*. – Krasnodar: Prosveshcheniye-Yug, 2021. – 101 s.

2. Kruglova N.N. Otsenka kachestva pyltsevykh zeren tsvetkovykh rasteniy (obzor) // *Bulleten GNBS*. – 2020. – Вып. 135. – С. 50–56.

3. Voronova O.N., Gavrilova V.A. Kolichestvennyy i kachestvennyy analiz pyltsy podsolnechnika (*Helianthus* L.) i ego ispolzovaniye v selektsionnoy rabote // *Trudy po prikladnoy botanike, genetiki i selektsii*. – 2019. – Вып. 180 (1). – С. 95–104.

4. Murthy M.N.K., Reddy Y.A.N., Virupakshappa K. Development of suitable germination medium for trinucleate pollen grains: an illustration with sunflower // *Oilseeds Research*. – 1994. – Vol. 11 (2). – P. 304–307.

5. Atlagic J., Terzic S., Marjanovic-Jeromela A. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species // *Industrial Crops and Products*. – 2012. – Vol. 35. – P. 88–91.

6. Todorova M., Nenova N., Encheva J. Study on in vitro pollen germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.) before and after gamma-irradiation // *Bulg. J. Agric. Sci.* – 2004. – Vol. 10. – P. 65–70.

7. Humera Razzaq, Shamsa Kanwal, Muhammad Hammad Nadeem Tahir, Bushra Sadia Effects of spring and autumn seasons on the variability among sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions for pollen viability, germination and morphology // *International Journal of Scientific, Engineering Research*. – 2015. – Vol. 6 (1). – P. 2035–2044.

8. Astiz V., Hernandez L.F. Pollen production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is affected by air temperature and relative humidity during early reproductive growth // *Int. J. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 82. – P. 297–302.

9. Del Pino A.M., Pannacci E., Di Michele A., Bravi, E., Marconi O., Tei F., Palmerini C.A. Selective Inhibition of Wild Sunflower Reproduction with Mugwort Aqueous Extract, Tested on Cytosolic Ca²⁺ and Germination of the Pollen Grains // *Plants*. – 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10071364>.

10. Demurin Ya.N. Rubanova O.A. Pyltsevoy analiz rasteniy razlichnykh genotipov podsolnechnika // *Maslichnyye kulturey*. – 2021. – Вып. 2 (186). – С. 10–17.

Сведения об авторах

Я.Н. Демури́н, зав. лаб., гл. науч. сотр., д-р биол. наук, профессор

О.А. Рубанова, мл. науч. сотр., канд. биол. наук

Ю.В. Чебанова, ст. науч. сотр., канд. биол. наук

Н.В. Каменева, аспирант

Получено/Received

14.03.2022

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

14.03.2022

Получено после доработки/Manuscript revised

14.03.2022

Принято/Accepted

17.03.2022

Manuscript on-line

30.05.2022