

ИЗУЧЕНИЕ ВОПРОСОВ ХРАНЕНИЯ ПЫЛЬЦЫ В СВЯЗИ С МЕЖВИДОВОЙ
ГИБРИДИЗАЦИЕЙ У ДЕКОРАТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА
НОРИЧНИКОВЫЕ (*SCROPHULARIACEAE* JUSS.)

О.Е. Khanbabaeva, I.V. Berezkina,
V.N. Sorokopudov

STUDYING OF POLLEN STORAGE QUESTIONS IN CONNECTION OF INTERSPECIFIC
HYBRIDIZATION IN DECORATIVE REPRESENTATIVES OF *SCROPHULARIACEAE* JUSS.

Ханбабаева О.Е. – канд. с.-х. наук, доц. каф. ландшафтной архитектуры Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: hanbabaeva@yandex.ru

Березкина И.В. – канд. с.-х. наук, доц. каф. ландшафтной архитектуры Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: betula.berezkina@gmail.com

Сорокопудов В.Н. – д-р с.-х. наук, проф., зав. Центром генетики, селекции и интродукции садовых культур Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, г. Москва.

E-mail: sorokopud2301@mail.ru

Khanbabayeva O.E. – Cand Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: hanbabaeva@yandex.ru

Berezkina I.V. – Cand Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: betula.berezkina@gmail.com

Sorokopudov V.N. – Dr. Agr. Sci, Prof., Head, Center of Genetics, Selection and Introduction of Garden Cultures, All-Russia Selection Institute of Technology of Gardening and Nursery, Moscow.

E-mail: sorokopud2301@mail.ru

Цель исследования – изучение вопросов хранения пыльцы некоторых видов Норичниковых в связи с межвидовой гибридизацией. Задачи исследования: изучить фертильность и стерильность пыльцы; сроки и продолжительность хранения пыльцы; способы хранения, продляющие жизнеспособность пыльцы у изучаемых видов. Объекты исследования – 4 вида из семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae* Juss.): мимулюс Бернетта, азарина лазающая, антирринум большой, пенстемон гибридный. Исследование выполнено в ФГОУ ВО РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева. Методы исследования: учеты и наблюдения, статистическая обработка данных с применением дисперсионного анализа. Методика исследования: ацетокарминное окрашивание пыльцы; подсчет фертильных и стерильных зерен под микроскопом. Большое влияние на сохранение фертильных пыльцевых зерен оказал фактор «вид растения, генотип» – 39 %, доля совместного взаимодействия факторов «вид и условия хранения» – 28 %. Менее всего на фертильность пыльцы влияют условия хранения – 15 %. Самый простой и доступный способ хранения пыльцы – это хранение предварительно подсушенной пыльцы в бумажных пакетах при пониженной температуре +4–5 °С в холодильной

камере. Для длительного хранения, более 30 дней, следует использовать эксикатор с хлористым калием. Повышение фертильности пыльцы после хранения в эксикаторе отмечено только у антирринума большого, в то же время остальные изучаемые виды (пенстемон гибридный и Хартвейга и азарина лазающая) существенно снизили качество пыльцы при хранении в эксикаторе. Это связано с тем, что в эксикаторе влажность постоянная, а для эффективного опыления требуется подсушенная пыльца, с более низкой общей влажностью.

Ключевые слова: пыльца, хранение пыльцы, фертильность, стерильность, опыление, пыльцевое зерно, семейство Норичниковые, декоративные культуры.

The purpose of the research was to study the storage of pollen of some species of *Scrophulariaceae* Juss, in connection with interspecies hybridization. The tasks were to study the fertility and sterility of pollen; timing and duration of storage of pollen; storage methods that prolong the viability of pollen in studied species. The objects of study were 4 species of the family *Scrophulariaceae* Juss.: *Asarina scandens* L. = (*Maurandia semperflorens*, *Antirrhinum majus* L., *Mimulus* x

*hybridus Hort., Penstemon x hybridus Groenl. et Ruempl. The study was performed at Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev. The methods of the study: accounting and observations, statistical data processing using variance analysis. The research techniques were acetocarmine pollen staining; counting fertile and sterile grains under a microscope. A great influence on the conservation of fertile pollen grains was made by the factor "Plant species, genotype" – 39 %, share interaction of factors "type and storage conditions" – 28 %. Least of all, pollen fertility was affected by storage conditions – 15 %. The easiest and available way to store pollen is to store pre-dried pollen in paper bags at a reduced temperature of + 4-5°C in the refrigerator. For long-term storage, more than 30 days, one should use a desiccator with potassium chloride. An increase in pollen fertility after storage in a desiccator was observed only in *Antirrhinum majus L.*; at the same time, the other studied species of *Penstemon x hybridus Groenl. et Ruempl.*, *Asarina scandens L.* significantly reduced the quality of pollen during storage in a desiccator. This is due to the fact that the humidity in a desiccator is constant, and for effective pollination requires dried pollen, with a lower total humidity.*

Keywords: pollen, pollen storage, fertility, sterility, pollination, pollen grain, *Scrophulariaceae Juss.*, decorative cultures.

Введение. В связи с необходимостью расширения цветочного ассортимента для озеленения городов нужно применять новые устойчивые и высокодекоративные цветочные культуры. Среди семейства Норичниковые очень много декоративных, перспективных для этих целей культур. Кроме того, благодаря селекционному процессу, постоянно появляются новые гибриды и сорта у таких уже популярных культур, как антирринум, мимюлюс, пенстемон и др.

Вопросы хранения пыльцы очень тесно связаны с опылением и селекционным процессом в целом. Поскольку все виды цветут в разные сроки, то вопрос длительности сохранения фертильности пыльцы, продолжительность ее хранения в связи с последующей межвидовой гибридизацией становится актуальным.

Научная новизна. Для успешного проведения межвидовой гибридизации внутри семейства Норичниковые изучена фертильность и стерильность пыльцы некоторых декоративных представителей семейства, сроков и способов хранения пыльцы.

Практическая значимость. С помощью межвидовой гибридизации возможно получение новых перспективных для цветоводства и озеленения межвидовых гибридов для средней полосы.

Цель исследования: изучение вопросов хранения пыльцы некоторых видов Норичниковых в связи с межвидовой гибридизацией.

Задачи исследования: изучить фертильность и стерильность пыльцы; сроки и продолжительность хранения пыльцы; способы хранения, prolonging жизнеспособность пыльцы у изучаемых видов.

Объекты и методы исследования

Объект исследования – пыльца из цветков и бутонов некоторых декоративных представителей семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae Juss.*): азарины лазящей (*Asarina scandens L. = (Maurandia semperflorens)*), антирринума большого (*Antirrhinum majus L.*), мимюлюса Бернетта (*Mimulus x Bernettii Hort.*), пенстемона гибридного (*Penstemon x hybridus Groenl. et Ruempl.*).

Методы исследования – учеты и наблюдения, статистическая обработка данных с применением дисперсионного анализа.

Методики исследования – ацетокарминное окрашивание пыльцы; подсчет фертильных и стерильных зерен под микроскопом.

Результаты исследования и их обсуждение.

Для успешной межвидовой гибридизации важно изучение вопросов хранения пыльцы: условий хранения, сроков хранения и способности к опылению у сохраненной пыльцы. Данные вопросы подлежат изучению, так как изучаемые представители семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae Juss.*) цветут в разные сроки, и поэтому для проведения межвидовой гибридизации с целью получения нового селекционного материала возможно проведение таких опылений сохраненной и жизнеспособной пыльцой. К тому же при длительных сроках хранения возможна передача и транспортировка пыльцы на дальние расстояния. Вопросы межвидовой гибридизации и несовместимости, связанной с ней, изучены в работах Б.П. Банниковой (1963, 1964), В.А. Поддубной-Арнольди (1964) [3]; на пшенице и ржи, табаке – В.П. Банниковой (1965, 1968, 1972, 1973); сцилле сибирской – Е.Н. Герасимовой-Навашиной (1957), Е.Н. Герасимовой-Навашиной, Т.Б. Батыгиной (1958, 1959); календуле лекарственной – М.А. Плиско (1971, 1977).

Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок – один из важнейших вопросов в процессе размножения растений, от него в большой степени зависит успех процесса оплодотворения, а следовательно и последующее формирование полноценных семян (Банникова В.П., 1968) [1].

Развитие мужского гаметофита достаточно единообразно у Покрытосеменных и состоит из ряда последовательных процессов (Герасимова-Навашина Е.Н., 1951). Структура и функциональные особенности пыльцевых зерен проанализи-

рованы в работах В.А. Поддубной-Арнольди (1976), С.А. Резниковой (1984).

Одним из главных органов, в котором образуется пыльца, является пыльник. Он состоит из двух половинок и связника (Соколова Н.П., 1980). Обычно он содержит четыре отверстия – гнезда, в которых образуется пыльца. Зрелые тычинки у большинства Норичниковых имеют ярко-желтую окраску. У зрелых тычинок из клеток археспориальной ткани образуются клетки микроспор. В результате мейотического деления из каждой материнской клетки образуется четыре гаплоидные микроспоры. До момента раскрытия пыльника в них происходит митотическое деление и из каждой микроспоры формируется пыльцевое зерно или пылинка. Совокупность пылинок называют пыльцой (Соколова Н.П., 1980). Каждая пылинка состоит из двух клеток – вегетативной и генеративной и покрыта двумя оболочками. Верхняя оболочка пылинки (экзина) более толстая, имеет небольшие выросты и отверстия, нижняя тонкая (интина) [5].

Форма пыльцевых зерен на момент раскрытия тетраэдрическая, цвет светло-желтый, размер 1×10^{-9} м. Окрашивание зрелой пыльцы проводили ацетокармином. При этом фертильные пыльце-

вые зерна окрашиваются в красно-малиновый цвет, а стерильные пыльцевые зерна не окрашиваются, остаются бесцветными (рис. 1).

Хорошее окрашивание хромосом в пыльцевых зернах большинства растений дает краситель – ацетокармин [2]. Способ приготовления препарата зависит от размеров пыльника. У большинства Норичниковых пыльник достаточно крупный, например у антирринума, азарины, пенстемона, коровяка, наперстянки. Такой пыльник помещают на предметное стекло в каплю ацетокармина, затем у него отрезается широкий конец и содержимое выдавливается в краситель. Оболочки пыльника удаляются, после чего капля красителя с материалом накрывается покровным стеклом. Мелкий по размеру пыльник – у немезии, диасции, залужанский, он целиком помещается в каплю ацетокармина. Приготовленный препарат несколько раз нагревают над пламенем спиртовки. При этом необходимо следить, чтобы подогреваемая жидкость не закипела. Избыток ацетокармина убирается фильтровальной бумагой после того, как пыльца окрасится. Мелкие пыльники хорошо мацеруются при нагревании в красителе и легко раздавливаются при постукивании по покровному стеклу.



Рис. 1. Пыльцевые зерна пенстемона Хартвейга (стрелка указывает на стерильные зерна)

Для того чтобы рассмотреть хромосомы в пыльцевом зерне, бутоны с пыльниками, находящимися в нужной стадии деления, нужно зафиксировать в фиксаторе Карнуа (3 : 1) или Батталья (5 : 5 : 1 : 1) и уже затем окрашивать. В стадии метафазы первого митоза, после окрашивания ацетокармином, ярко-красные хромосомы четко видны на фоне светло-розовой цитоплазмы [2].

Экспериментальные исследования проводили в 2016 г. на базе Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева в Лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур.

Объект исследования – зрелая и высушенная при комнатной температуре пыльца 4 травянистых видов из семейства Норичниковые: азарины

лазаящая, антирринум большой, мимулус Бернетта, пенстемон гибридный.

Существует несколько способов хранения пыльцы [2]. Самый простой из них – это хранение предварительно подсушенной пыльцы в бумажных пакетах при комнатной температуре, при пониженной температуре $+4-5$ °С в холодильной камере. Кроме того, несколько работ посвящено хранению пыльцы в эксикаторе с хлористым кальцием (рис. 2). При таком способе хранения пыльца защищена от излишней влажности воздуха, которая значительно снижает фертильность пыльцы.

На дно стеклянного полупрозрачного эксикатора по ГОСТУ 25336 помещают хлористый кальций (хлорид кальция), который по ГОСТ 450 предвари-

тельно прокаливают при температуре 700–800 °С. Срок использования песка считают равным 8 месяцев со дня прокаливания. Для полной герметизации край верхней крышки смазывают вазелином, есть также возможность откачать полностью воздух, но для хранения пыльцы такой необходимости нет.

По полученным данным хранение в эксикаторе целесообразно применять, если требуется хранение более 30 дней. При менее долгом сроке возможно хранение в обычных бумажных пакетах, с предварительным просушиванием.

Проведен двухфакторный дисперсионный анализ, результаты которого представлены в таблице 1.

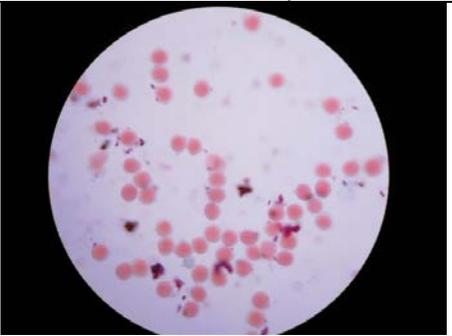
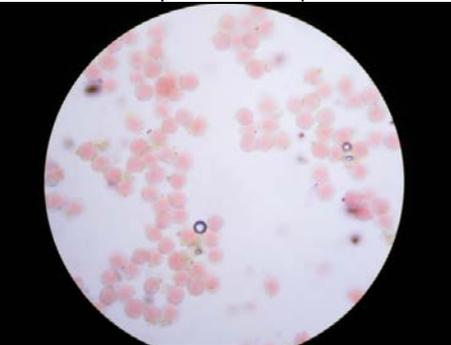
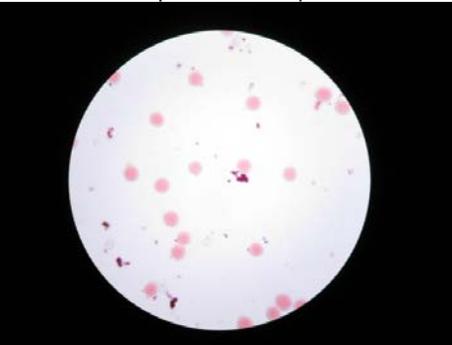
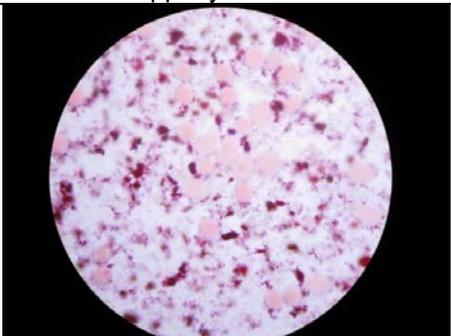
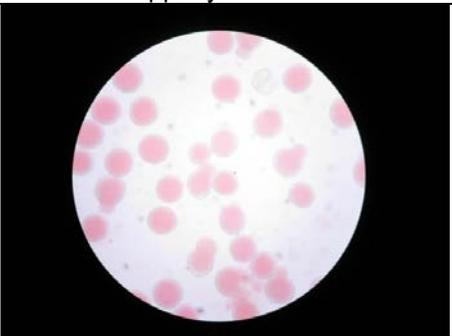
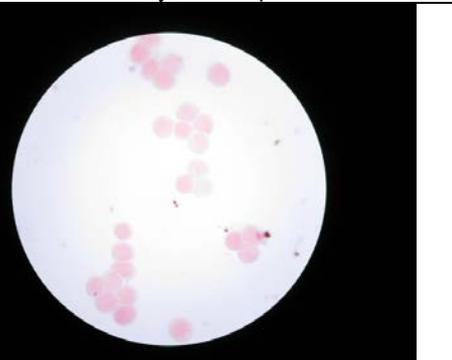
В эксикаторе	Без эксикатора
	
Азарина лазащая	Азарина лазащая
	
Антирринум большой	Антирринум большой
	
Мимулюс Бернетта	Мимулюс Бернетта
	
Пенстемон гибридный	Пенстемон гибридный

Рис. 2. Хранение пыльцы в эксикаторе с хлористым кальцием, без эксикатора

Таблица 1

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа изменчивости количества фертильных пыльцевых зерен у разных представителей семейства Норичниковые в зависимости от вида и условий хранения

Источник вариации	SS	df	ms	σ^2	F	F ₀₅	F ₀₁	p ⁱⁿ %	HCP ₀₅
Общая	5787,2	23		441,8				100	
Вид	2313,5	3	771,17	173,4	9,9	3,2	5,3	39	17,6
Условия хранения	888,3	1	888,3	67,5	11,4	4,49	8,5	15	7,6
Вид x Условия хранения	1341,5	3	447,2	123,1	5,7	3,24	5,3	28	27,5
Случайная	1243,9	16	77,7	77,7				18	

Было установлено достоверное влияние вида, условий хранения и их взаимодействия на изменчивость количества фертильных пыльцевых зерен у представителей семейства Норичниковых (см. табл. 1) [4].

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа установлены доли влияния факторов – вид (генотип растения) – 39 % и условия хранения (с эксикатором и без эксикатора) – 15

%. Ясно, что в целом по количеству фертильных пыльцевых зерен пыльца, хранящаяся без эксикатора, достоверно отличается по степени фертильности от пыльцы, хранящейся с эксикатором. Причем доля влияния взаимодействия этих факторов составила 28 %, что говорит о действительном влиянии способа хранения пыльцы у отдельных видов (рис. 3).

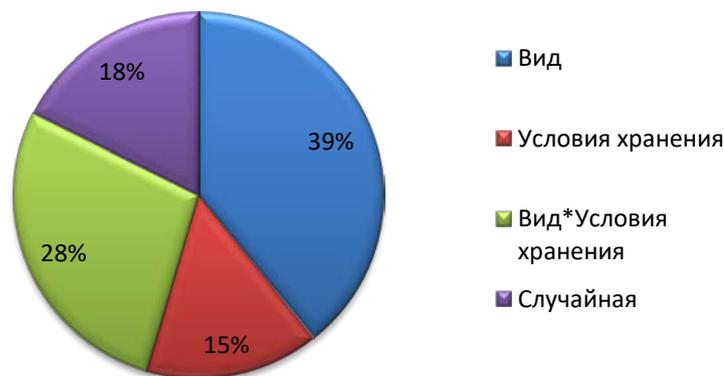


Рис. 3. Диаграмма долей влияния факторов на фертильность пыльцы у изучаемых видов, %

Анализируя отдельные виды при хранении пыльцы, можно сделать вывод, что наиболее выражены различия в способах хранения у азарины лазящей и пенстемона гибридного. Причем хранение пыльцы азарины в эксикаторе ухудшило фертильность пыльцы и как следствие способность к опылению. Количество фертильных пыльцевых зерен после хранения в эксикаторе в среднем по всем полям зрения микроскопа составило 37,1 %, а без него – 68,1

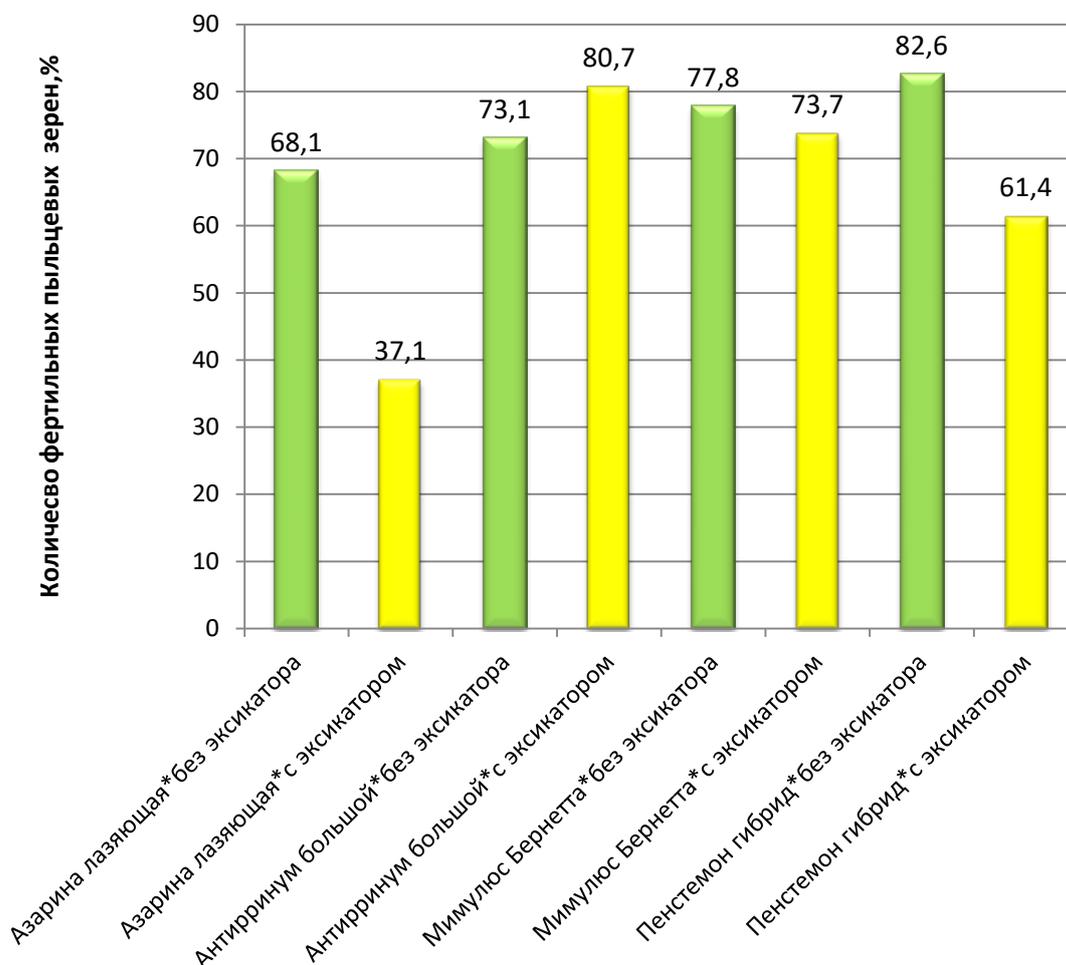
%. Данные различия являются существенными (HCP₀₅ (фактор «вид») – 17,6). У пенстемона гибридного также отмечали существенное снижение фертильности пыльцы при хранении в эксикаторе: 61,4 % фертильных зерен при хранении в эксикаторе и 82,6 % при хранении пыльцы в бумажных пакетах.

Только у антирринума большого хранение пыльцы в эксикаторе оказало положительное влияние на фертильность пыльцы (80,7 % фер-

тильных зерен в эксикаторе и 73,1 % без эксикатора). У мимулуса Бернетта способ хранения пыльцы практически не повлиял на фертильность пыльцевых зерен, которая не зависимо от способа хранения составляет более 70 % и является достаточно высокой [4].

Среди взаимно влияющих факторов «вид» и «условия хранения» следует отметить пенсте-

мон гибридный, хранение без эксикатора 82,6 % – это максимальное количество фертильных пыльцевых зерен; минимальное количество фертильных пыльцевых зерен – азарина лазающая, хранение с эксикатором составило 37,1 % (рис. 4).



Взаимодействие факторов (Вид x условия хранения)

НСР₀₅ фактор "Вид"=17,6

НСР₀₅ фактор "Условия хранения"=7,6

НСР₀₅ фактор "Вид x условия хранения"=27,5

Рис. 4. Групповые средние изучаемых видов по фертильности пыльцы, %

Самое большое влияние на сохранение фертильных пыльцевых зерен оказал фактор «вид растения, генотип» – 39 %. Вторым фактором по силе влияния является совместное взаимодей-

ствие факторов «вид» и «условия хранения» – 28 %. Случайная вариация при этом составила 18 %. Менее всего влияют на количество фер-

тивных пыльцевых зерен «условия хранения» – 15 % (рис. 4).

Таким образом, наибольшее влияние на количество фертильных пыльцевых зерен оказывает вид растения (генотип конкретного вида) [4]. Это можно объяснить тем, что пыльца различных видов семейства Норичниковые по-разному переносит хранение в разных условиях, особенно при изменении влажности воздуха.

Согласно полученным данным, повышение фертильности пыльцы после хранения в эксикаторе отмечено только у антирринума большого, в то же время остальные изучаемые виды пенстемон гибридный и азарина лазящая существенно снизили качество пыльцы при хранении в эксикаторе. Это, скорее всего, связано с тем, что в эксикаторе влажность постоянная, а для эффективного опыления требуется подсушенная пыльца, с более низкой общей влажностью. Это обстоятельство подтверждает также низкая степень завязываемости семян при опылении цветков Норичниковых во влажную погоду, в вечерние и утренние часы. При повышенной или нормальной влажности пыльца быстро теряет свои свойства. Именно поэтому в условиях открытого грунта во влажную погоду (в течение 1-3 дней) не рекомендуется проведение опылений, так как при таких условиях пыльца быстро теряет фертильность.

Выводы. По результатам проведенных исследований, можно сделать вывод, что на сроки хранения пыльцы и успешное проведение межвидовой гибридизации существенное влияние оказывают сроки и способ хранения пыльцы. Рекомендуется хранить пыльцу Норичниковых в бумажных пакетах, с предварительным подсушиванием. Для длительного хранения пыльцы (более 30 дней) можно применять эксикатор с хлористым кальцием, где поддерживается оптимальная влажность и, как следствие, достаточная фертильность пыльцы.

Фертильность пыльцы у Норичниковых обусловлена генотипом растения (доля влияния 39 %), а также совместным влиянием факторов «вид» и «условия хранения» – 28 %, и лишь на 15 % зависит от условий хранения.

Для успешного проведения межвидовой гибридизации необходимо изучить фертильность пыльцы у выбранных объектов предложенными методами анализа.

Литература

1. Банникова В.П. Межвидовая несовместимость у растений. – Киев: Наук. думка, 1986. – 232 с.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1970. – 255 с.
3. Поддубная-Арнольди В.А. Общая эмбриология покрытосеменных растений. – М.: Наука, 1964. – 482 с.
4. Смиряев А.В., Кильчевский А.В. Генетика популяций и количественных признаков. – М.: КолосС, 2007. – 272 с.
5. Соколова Н.П. Практикум по ботанике. – М.: Агропромиздат, 1990. – 205 с.

Literatura

1. Bannikova V.P. Mezhhvidovaja nesovmestimost' u rastenij. – Kiev: Nauk. dumka, 1986. – 232 s.
2. Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij. – M.: Kolos, 1970. – 255 s.
3. Poddubnaja-Arnol'di V.A. Obshhaja jembriologija pokrytosemennyh rastenij. – M.: Nauka, 1964. – 482 s.
4. Smirjaev A.V., Kil'chevskij A.V. Genetika populjacij i kolichestvennyh priznakov. – M.: KolosS, 2007. – 272 s.
5. Sokolova N.P. Praktikum po botanike. – M.: Agropromizdat, 1990. – 205 s.