

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОГАМЕТОФИТНОГО ОТБОРА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕНОТИПОВ ЛЮПИНА ПО УСТОЙЧИВОСТИ К КОНТРАСТНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Е.А. Брыль, И.Б. Саук, В.С. Анохина

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь  
anokhina@bsu.by

Селекция растений на устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам является одним из приоритетных направлений сельскохозяйственной науки. Традиционные методы селекции на устойчивость к различным факторам среды сложны, длительны и не всегда эффективны. В связи с этим является актуальной разработка экспресс-метода диагностики устойчивости вегетирующего растения к биотическим и абиотическим стрессам.

В этой связи особый интерес представляют начатые и успешно используемые в последние годы работы по гаметной селекции, позволяющие провести раннюю оценку селекционных образцов по реакции гаметофита растений на воздействие биотических и абиотических факторов среды. Гаметная селекция представляет собой отбор перспективных генотипов в гаплоидной фазе развития растений [1]. Благодаря наличию корреляции между резистентностью спорофита и гаметофита гаметная селекция успешно используется для оценки устойчивости растений к неблагоприятному влиянию экстремальных абиотических факторов среды [2-4]. Изучение жизнеспособности пыльцы у *Arabidopsis thaliana* подтвердило влияние температурного фактора на процент прорастания пыльцы и длину пыльцевых трубок [5].

Целью нашей работы было изучение реакции мужского гаметофита растений на высоко- и низкотемпературный стресс (на примере люпина) для определения критериев гаметофитного отбора на устойчивость генотипов к действию контрастных температур.

Объектом исследования служила пыльца образцов люпина узколистного и желтого. Используемые в опыте образцы люпина желтого и узколистного отличались по происхождению, морфологическим и хозяйственно ценным признакам, периоду вегетации и длительности производственного их возделывания. В качестве контрастных были определены следующие температуры: 3 °С, 8 °С, 35 °С, 40 °С. Для контроля в эксперименте использовали оптимальную для жизнедеятельности пыльцы температуру (22 °С). Оценка реакции мужского гаметофита на действие контрастных температур проводили по двум параметрам: проценту прорастания пыльцы и длине пыльцевых трубок. Результаты изучения действия контрастных температур на прорастание пыльцы и длину пыльцевых трубок сортообразцов люпина узколистного и желтого представлены в таблицах 1 и 2.

При анализе процента жизнеспособности пыльцы (табл. 1) было выявлено, что относительно устойчивыми к действию контрастных температур оказались все изученные сортообразцы люпина узколистного. В зависимости от сорта этот показатель в опытных вариантах был равен от 70 до 97 % относительно контроля.

В результате оценки гаметофита сортообразцов люпина желтого по устойчивости к контрастным температурам установлено, что под действием контрастных температур показатель жизнеспособности пыльцы, так же как и у узколистного люпина, снизился незначительно у всех изученных образцов. Исключение характерно для сортов Кастрычнік, Afus, Академический 1, у которых действие самых низких температур приводило к резкому снижению прорастания пыльцы.

По критерию длины пыльцевых трубок (таблица 2) к действию контрастных температур наиболее устойчивыми оказались генотипы сортов люпина узколистного - Кристалл и Першацвет, длина пыльцевых трубок которых в опытных вариантах снизилась не более 40 % от контроля. При анализе же длины пыльцевых трубок у люпина желтого установлено, что наиболее устойчивыми к воздействию высоких температур явились образцы М-4

(69,23 % и 65,08 % от контроля), Академический 1 (73,23 % от контроля) и Кастрычнік (76,49 %). Наиболее устойчивым к низкотемпературному стрессу оказался генотип образца М-3 (62,75 % от контроля). Генотипы остальных изученных образцов проявили слабую устойчивость к низкотемпературному стрессу.

Таблица 1

**Прорастание пыльцы сортообразцов люпина при действии контрастных температур (% к контролю)**

Сорт, образец	Варианты опыта				
	22 °С контроль	3 °С	8 °С	35 °С	40 °С
<b>Люпин узколистный</b>					
Миртан	100	83,96	84,46	89,45	94,03
Шуагіе	100	70,21	85,21	85,43	70,21
Владлен	100	83,25	79,51	88,11	72,64
Брянский 1121	100	71,65	81,00	84,85	85,79
Дикаф 14	100	77,41	76,88	79,98	82,49
Кристалл	100	86,83	80,50	91,29	93,02
Першацвет	100	88,97	90,66	96,29	95,63
<b>Люпин желтый</b>					
Кастрычнік	100	34,62	86,58	91,02	98,20
Afus	100	31,16	72,50	91,06	97,57
Академический 1	100	21,99	82,21	99,48	99,05
М-3	100	83,95	89,90	94,57	65,64
М-4	100	78,54	90,64	88,16	87,94
Мутантная линия	100	69,15	85,05	97,93	92,39

Таблица 2

**Длина пыльцевых трубок сортообразцов люпина при действии контрастных температур (% к контролю)**

Сорт, образец	Варианты опыта				
	22 °С контроль	3 °С	8 °С	35 °С	40 °С
<b>Люпин узколистный</b>					
Миртан	100	34,82	40,66	52,91	51,36
Шуагіе	100	24,06	49,66	62,47	33,33
Владлен	100	27,16	47,11	48,76	38,88
Брянский 1121	100	30,24	33,24	53,95	53,95
Дикаф 14	100	31,14	39,45	54,35	36,94
Кристалл	100	41,72	62,46	60,24	46,66
Першацвет	100	56,71	72,83	82,98	70,74
<b>Люпин желтый</b>					
Кастрычнік	100	24,88	48,38	52,99	76,49
Afus	100	16,40	26,40	40,00	68,40
Академический 1	100	23,42	29,73	40,60	73,23
М-3	100	20,80	62,75	40,60	54,02
М-4	100	20,71	47,33	69,23	65,08
Мутантная линия	100	34,21	40,00	45,26	49,84

Таким образом: установлена сортоспецифическая реакция пыльцы на воздействие контрастных температур, что позволяет использовать ее параметры как показатели устойчивости генотипов люпина к температурному стрессу; выделены образцы люпина желтого и узколистного, пыльца которых наиболее устойчива к изученным температурам; выявленная разная реакция изученных генотипов люпина на температурный стресс позволяет отбирать высоко толерантные формы как для более ранних посевов, так и вести селекцию сорта с высокой жизнеспособностью пыльцы при разных температурных стрессах.

1. Лях, В.А. Микрогаметофитный отбор и его роль в эволюции покрытосемянных растений/ В.А. Лях // Цитология и генетика . – 1995. – Т. 29, №6 .– С.76 – 82.
2. Лях, В.А. Гаметный отбор как метод селекции растений // Современные методы и подходы в селекции растений. Кишинев: ШТИИЦ. – 1991. – С.14-21.
3. Жученко, А.А. Роль репродуктивного направления селекции культурных растений / А.А. Жученко // Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений. М.:ВНИИССОК – 2001. – С.7-46.
4. Кильчевский, А.В. Изучение корреляционных связей между признаками спорофита и гаметофита томата в диаллельных скрещиваниях / А.В. Кильчевский, Н.Ю. Антропенко, И.Г. Пугачева // Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства овощных культур. М.: ВНИИССОК. – 2005. – Т. 2. – С.150-152.
5. Boavida L.S. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana* / L.S. Boavida, S. McCormick // The Plant Journal. – 2007. V 52. – P.570 – 582.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР-АНАЛИЗА СОРТООБРАЗЦОВ ГАЛЕГИ ВОСТОЧНОЙ С RAPD-ПРАЙМЕРАМИ

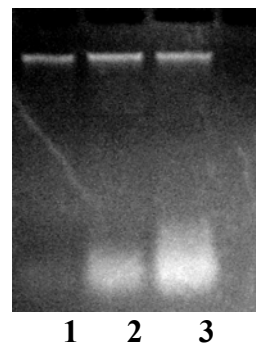
**В.И. Бушуева**

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», Горки, Беларусь  
vibush@mail.ru*

На кафедре селекции и генетики УО «БГСХА» созданы новые сортообразцы галеги восточной, фенотипически различающиеся между собой. Для установления различий между ними на генетическом уровне был использован метод ПЦР-анализа с RAPD-праймерами. Исследования проводились во ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. Объектами исследований служили три сортообразца, наиболее контрастно различающиеся между собой по морфологическим признакам: СЭГ-1–белоцветковый со светло-зелеными листьями и стеблями, СЭГ-2– сиреневоцветковый с темно-зелеными листьями и стеблями, СЭГ-4– синецветковый с темно-зелеными листьями и стеблями. Препараты образцов ДНК для анализа были получены путем проращивания в чашках Петри 120 семян каждого сортообразца. Навеску средней части ткани 6-дневных проростков (60 мг) использовали для выделения ДНК методом Эдвардса (Edwards et al., 1991) с последующей очисткой смесью хлороформа и изоамилового спирта (24:1). Элетрофореграмма образцов геномной ДНК представлена на рис. 1.

RAPD-анализ проводили в соответствии с методикой, разработанной Вильямсом (Williams et al., 1990), с модификациями. ПЦР- реакцию ставили в программируемом термоциклере «Biokom» (Россия). Фрагменты амплифицированной ДНК получали в результате выполнения программы из трех этапов с чередованием температурных и временных параметров. Основной этап состоял из 37 циклов полимеразной цепной реакции с температурой отжига праймеров 36 °С. Для анализа использовали реактивы фирмы «Syntol» и «Helikon» (Россия). ПЦР-продукты разделяли с помощью электрофореза в 1,4 % агарозном геле (Маниатис, 1983) и визуализировали под ультрафиолетовым светом после прокрашивания в 0,5 мг/мл растворе бромистого этидия.

Образцы ДНК анализировали с использованием 9 праймеров произвольного сиквенса, изначально разработанных фирмой «Oregon Technologies» (США). Перечень праймеров с их сиквенсами приведен в таблице 1. Синтез праймеров был осуществлен фирмой «Syntol».



**Рис. 1.** Геномная ДНК сортообразцов галеги: 1 – «СЭГ-4»; 2 – «СЭГ-2»; 3 – «СЭГ-1».