

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЫЛЬЦЫ ГЕНОТИПОВ ФУНДУКА В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Н. В. ЛУГОВЦОВА, Н. В. КУХАРЧИК, М. Н. БОРИСЕНКО,
В. В. ВАСЕХА, К. А. ЧЕРНООКАЯ

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: choma8787@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Для селекции, создания новых сортов и получения качественного урожая в промышленных садах важным аспектом является качество пыльцы выбранных генотипов. В данной статье представлены результаты лабораторных исследований качества пыльцы за 2020 и 2022 г. Фертильность определяли методом окрашивания индигокармином, жизнеспособность – методом проращивания на подвешенных каплях сахарозы, прорастание на пестиках, опыленных в лабораторных условиях, – методом флуоресцентной микроскопии. Для исследования были отобраны генотипы разного генетического происхождения: западноевропейские и российские сорта, белорусские сорта и гибриды, созданные в РУП «Институт плодоводства». Также представлен сравнительный анализ двух методов: проращивание пыльцы на сахарозе в чашках Петри и на пестиках.

Ключевые слова: *Corylus avellana*, фундук, сорт, гибрид, жизнеспособность, пыльца, пестик, световая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, искусственное опыление, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Лещина обыкновенная (*Corylus avellana*) и ее культурные сорта – фундук – ветроопыляемое однодомное растение с раздельнополыми цветками. Представителям рода *Corylus* свойственна диогогамия – неодновременное цветение мужских и женских соцветий [1, 2].

Качество пыльцы, жизнеспособность женской генеративной сферы и генетическая совместимость компонентов скрещивания определяют нормальное протекание процесса оплодотворения перекрестно опыляемых культур, в том числе фундука. Для фундука дополнительным фактором при подборе опылителей является подбор сортов, у которых одновременно цветут мужские и женские соцветия.

В селекционной работе при выполнении скрещиваний для получения гибридного потомства, в промышленных насаждениях – для получения товарного урожая, важное значение имеет качество пыльцы. Погодные условия в период формирования генеративных органов и во время цветения также могут влиять на жизнеспособность пыльцы одного и того же сорта. Поэтому качество пыльцы отличается по годам.

В русской научной литературе, говоря об анализе пыльцы, обычно используют термины «фертильные пыльцевые зерна» и «стерильные пыльцевые зерна» (Barykina et al., 2004), однако оценивают не их оплодотворяющую способность, а скорее потенциальную возможность опыления ими. В англоязычной литературе, наряду с термином *fertility*, используют термин *viability* (Atlagićet et al., 2012) или делят пыльцевые зерна на *nonaborted pollen grain* и *aborted pollen grain* (Peterson, Slovin, 2010). Нами используется терминология, принятая для плодовых культур в РУП «Институт плодоводства» [3]. Основными способами определения качества пыльцы являются оценка фертильности методом окрашивания кармином и определение жизнеспособности при проращивании на искусственной среде (в растворе сахарозы).

Метод окрашивания карминами (ацетокармин, индигокармин) (Navashin, 1936; Barykina et al., 2004) позволяет оценить форму, размер, состояние цитоплазмы пыльцевого зерна.

Оценить именно фертильность пыльцевых зерен, т. е. способность опылять, можно методом фиксации рылец, опыленных исследуемой пыльцой (Barykina et al., 2004; Voronova et al., 2011), с дальнейшим изучением методом люминесцентной микроскопии, который позволяет определить

количество прорастающих на пестике пыльцевых зерен. Количество прорастающих в первые дни после опыления пыльцевых зерен достоверно свидетельствует о качестве пыльцы, однако этот метод сложный. Также данный метод позволяет оценить совместимость вариантов скрещивания, наблюдая за дальнейшим ростом пыльцевых трубок в тканях пестика, определить совместимость родительских форм и изучить генетическую несовместимость сортов [4].

Цель исследований – сравнительная оценка качества пыльцы сортов фундука различного географического происхождения (российской, западноевропейской и белорусской селекции).

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований выбраны 10 генотипов, которые представлены тремя группами сортов и гибридов различного происхождения.

1. *Сорта российской селекции*: Екатерина – гибридный фундук, полученный от скрещивания отборной формы лещины обыкновенной № 454 с краснолистным гибридным фундуком № 236; Тамбовский ранний – отборный сеянец лещины обыкновенной (отобран в лесах Тамбовской области); Академик Яблоков – фундук 86 × Трапезунд; Московский рубин – Nottingham × смесь пыльцы краснолистных гибридов № 154, 155, 162, 167 [5].

2. *Сорта западноевропейской селекции*: Барселонский – испанский сорт, Косфорд – английский сорт [6].

3. *Сорта и гибриды белорусского происхождения*: Яшма (Тамбовский ранний × Тамбовский ранний); Лал (Екатерина св. оп.); 14-1/21 (Тамбовский ранний св. оп.); 14-5/6 (Тамбовский ранний св. оп.).

Данные сорта и гибриды произрастают в саду на территории опытного участка отдела селекции плодовых культур РУП «Институт плодоводства». Сад заложен в 2017 г. по схеме 4 × 2 м двухлетними саженцами.

Пыльца была собрана в феврале 2022 г. на опытном коллекционном участке отдела селекции РУП «Институт плодоводства». Для сбора пыльцы срезали ветки с большим количеством сережек с соблюдением пространственной изоляции, ставили их в воду в теплом помещении. Затем пыльцу собирали в стеклянные баночки, закрывали ватной пробкой и хранили в холодильнике при температуре 4 °С [6].

Определение качества пыльцы проводили 3 методами:

1. *Путем окрашивания индигокармином (фертильность)*. Данный метод основан на способности красителя – индигокармина – окрашивать содержимое пыльцевых зерен. Использовали 1%-ный водный раствор индигокармина. На предметное стекло наносили каплю красящего раствора, насыпали небольшое количество пыльцы и изучали под микроскопом Olympus VX41 при увеличении 10 × 10. Достоверность результатов достигалась оценкой 5 полей зрения [8].

2. *Путем проращивания пыльцевых зерен методом подвешенной капли раствора сахарозы в чашках Петри (жизнеспособность)*. В нижнюю часть чашки Петри выкладывали фильтровальную бумагу и смачивали ее дистиллированной водой. Верхнюю часть чашки Петри делили на 4 сектора с подписями концентраций сахарозы.

Просмотр и подсчет пыльцевых зерен осуществляли через 2 сут с помощью микроскопа Olympus VX41 при увеличении 10 × 10. Процент проросших пыльцевых зерен в каждом варианте определяли в 5–12 полях зрения таким образом, чтобы на каждый вариант опыта приходилось не менее 1000 пыльцевых зерен. Жизнеспособность проверяли на 3 концентрациях сахарозы – 20, 25 и 30 %. Количество жизнеспособной пыльцы рассчитывали как процент пыльцевых зерен, у которых есть пыльцевые трубки, по отношению к общему числу зерен в поле зрения. Проросшей считается пыльца с длиной пыльцевой трубки, превышающей диаметр пыльцевого зерна [8].

3. *Путем опыления пестиков с дальнейшим окрашиванием анилиновым голубым и изучением методом люминесцентной микроскопии* по методикам Y. O. Kho, J. Vaer [9], J. Liu [10], A. И. Литвака [11], Н. П. Березенко [12, 13]. Фиксацию пестиков проводили на 4, 7 и 10-е сут после опыления. Фиксировали по 2–5 женских цветочных почек в фиксирующем растворе, составленном из 6 частей 96%-ного спирта и 1 части ледяной уксусной кислоты (6 : 1); фиксатор является менее

жестким, позволяет увеличить время фиксации и обеспечить возможность серийной работы. Спустя 20–24 ч после фиксации материал дважды промывали в 70%-ном этиловом спирте и хранили в нем до приготовления препаратов.

Перед окрашиванием зафиксированный объект исследования промывали в течение 2–3 ч проточной водой, несколько раз споласкивали дистиллированной водой. Пестики, зафиксированные на 4 и 7-е сут, окрашивали без предварительной мацерации. Флуорохромирование проводили 0,1%-ным раствором анилинового голубого в течение 20–24 ч. После окрашивания объекты также промывались несколько раз дистиллированной водой. Для цитологических исследований готовили давленные в 15%-ном сахарном сиропе препараты. Препараты исследовали в день приготовления.

Рост пылевых трубок изучали на микроскопе Olympus BX41 в люминесцентном режиме с блоком *Olympus U-RFL-T* и светофильтрами U-25ND6 и U-25ND25 в падающем свете.

Фотографии прорастания пыльцы делались фотоаппаратом Olympus CAMEDIA C-5060 Wide Zoom, с помощью программного обеспечения Olympus DP-soft.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка пыльцы путем окрашивания индигокармином является самым простым методом определения ее качества и в первую очередь позволяет достоверно определить противоположный показатель – количество пыльцы, которая однозначно не будет участвовать в процессе оплодотворения. Нельзя говорить о том, что все хорошо окрашенные пылевые зерна нормального размера и формы способны полноценно оплодотворять, однако неокрашенные или деформированные пылевые зерна, отнесенные к стерильным, однозначно не способны к оплодотворению.

В течение 2020 и 2022 гг. высокое количество окрашиваемых, хорошо выполненных пылевых зерен отмечено у большинства сортов и находится в пределах 93–99 %, за исключением сортов западноевропейской селекции. Стабильно низкий показатель фертильности пыльцы отмечен у сорта Барселонский, низкий (по результатам 2020 г.) – у сорта Косфорд (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Определение качества пыльцы генотипов фундука путем окрашивания индигокармином в 2020, 2022 гг.

Географическое происхождение	Образец	Фертильная пыльца, %	
		2020 г.	2022 г.
Белорусская селекция	Лал	72,0	93,0
	Яшма	91,0	98,3
	14-1/21	51,0	99,0
	14-5/6	–	98,6
Западноевропейская селекция	Барселонский	43,0	32,0
	Косфорд	38,0	98,0
Российская селекция	Тамбовский ранний	94,0	96,0
	Екатерина	95,0	98,0

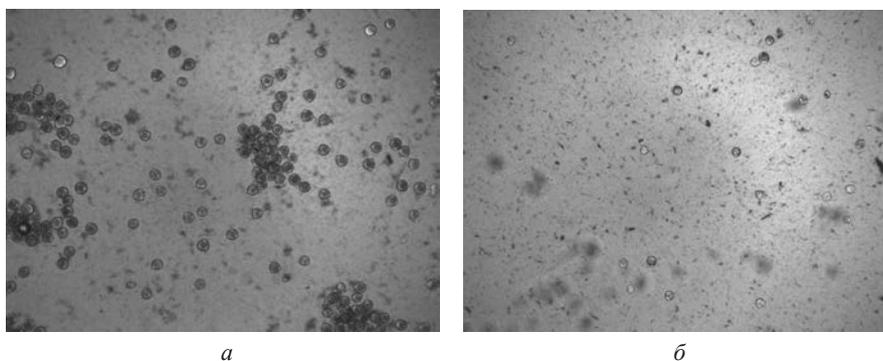


Рис. 1. Пыльца фундука (карминовый метод окрашивания, увеличение – 10 × 10): а – фертильная пыльца, сорт Яшма; б – стерильная пыльца, сорт Барселонский

Оценка жизнеспособности пыльцы при проращивании в растворе сахарозы позволила установить, что стабильно высокое количество прорастающих пыльцевых зерен в 2020 и 2022 г. характерно для сорта белорусской селекции Лал (41 и 30 % соответственно), сортов российской селекции – Московский рубин (45 и 26 % соответственно) и Академик Яблоков (39 и 26 % соответственно) (табл. 2, рис. 2). Необходимо отметить, что показатели жизнеспособности пыльцы значительно ниже показателей фертильности. Данная закономерность отмечается также для плодовых культур и подтверждает предположение о том, что карминовый метод окрашивания недостаточно информативен, позволяет установить количество стерильной пыльцы, которая не будет использована растением для оплодотворения.

Таблица 2. Определение качества пыльцы генотипов фундука путем проращивания в растворе сахарозы (2020, 2022 гг.)

Географическое происхождение	Образец	Жизнеспособная пыльца, %	
		2020 г.	2022 г.
Белорусская селекция	Яшма	54,0	4,2
	Лал	41,0	30,0
	14-1/21	33,0	9,5
	14-5/6	–	12,0
Западноевропейская селекция	Барселонский	28,0	0
	Косфорд	23,0	3,0
Российская селекция	Екатерина	35,0	18,0
	Тамбовский ранний	49,0	13,6
	Московский рубин	45,0	26,0
	Академик Яблоков	39,0	26,0

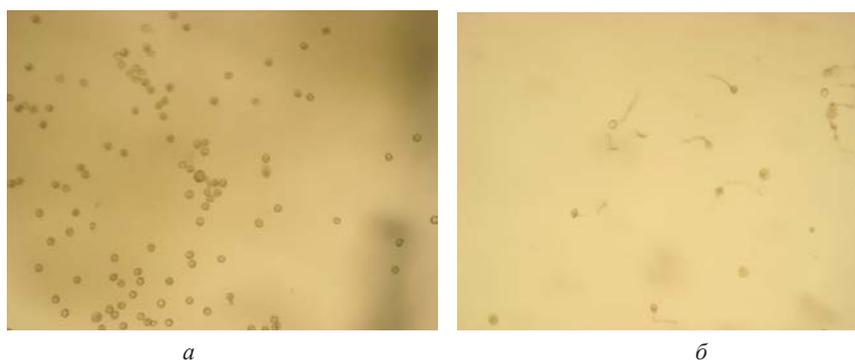


Рис. 2. Жизнеспособность пыльцы фундука (проращивание в 25%-ном растворе сахарозы, увеличение – 10 × 10):
 а – нежизнеспособная пыльца, сорт Барселонский; б – жизнеспособная пыльца с пыльцевыми трубками, сорт Московский рубин

В опыте применяли три концентрации сахарозы (20, 25 и 30 %), подсчет вели на концентрации с визуальным максимальным проращением пыльцевых зерен.

Так, для генотипов Академик Яблоков, Московский рубин, 14-5/6 максимальное проращение было на сахарозе с концентрацией 25 %; Екатерина, Лал, Тамбовский ранний, 14-1/21 – 20; Косфорд – 30 %. Исходя из полученных данных, сорта российской и белорусской селекции показывают способность лучше прорасти на концентрациях сахарозы 20–25 %.

Для всех сортов отмечены значительные колебания жизнеспособности и фертильности пыльцы в зависимости от года исследований. На рис. 3 представлены графики корреляции фертильности и жизнеспособности по 2020 и 2022 гг. исследований. На основании двухлетних наблюдений корреляция оценки качества пыльцы двумя вышеприведенными методами не установлена.

Для оценки качества пыльцы методом флуоресцентной микроскопии опыление женских цветков фундука проводили в лабораторных условиях. Для этого ветки исследуемых образцов

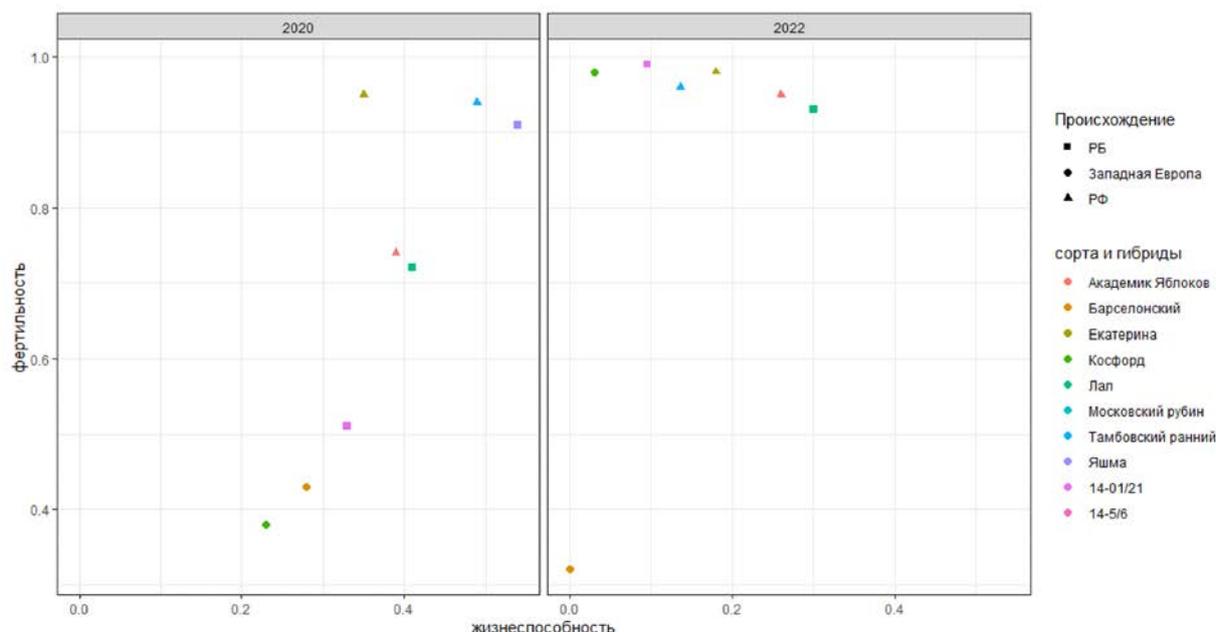


Рис. 3. Корреляция фертильности и жизнеспособности пыльцы в 2020 и 2022 гг.

срезали и ставили в воду, все мужские соцветия удаляли. Через 5–7 дней женские цветки в стадии полного цветения срезали с веток и опыляли пыльцой выбранных отцовских форм. Для опыления пестики полностью погружали в пыльцу. Хранили опыленные женские цветки в эпандорфах или стеклянных баночках с полоской фильтровальной бумаги, увлажненной дистиллированной водой, в условиях бытового холодильника (4 °С). Поскольку возможность опыления цветков фундука в лабораторных условиях исследовалась впервые, контролем явилось опыление изолированных заранее женских цветков в полевых условиях.

Для сравнительной оценки качества пыльцы использовали анализ прорастания пыльцевых зерен на пестиках на 4-е сут после опыления, когда пыльца только начинала прорастать. Это позволило минимизировать фактор несовместимости родительских компонентов скрещивания при самоопылении и близкородственном опылении (за исключением проявления несовместимости непосредственно при прорастании пыльцевого зерна). Для данного исследования не использовали сорта западноевропейской группы, поскольку качество их пыльцы по результатам прорастания в 2022 г. было низким (0–3 %).

Результаты оценки прорастания пыльцы на пестике приведены в табл. 3, на рис. 4. Из выбранных для изучения генотипов есть образцы, где материнская форма оказывала влияние на прорастание пыльцы уже на пестике. Для скрещиваний 14-5/6 × Лал и Яшма × 14-5/6 отмечено отсутствие прорастания пыльцевых зерен на пестике уже на первой стадии опыления.

Таблица 3. Определение качества пыльцы генотипов фундука путем проращивания на пестике (2022 г.)

Географическое происхождение	♂	Жизнеспособная пыльца, %					
		♀				Среднее	
		14-5/6	Яшма	Тамбовский ранний	Екатерина	по ♂	по ♂ без *
Белорусская селекция	Яшма	5,5*	1,5*	2,3*	5,8	4,3	6,0
	Лал	0	35,5	64,5	31,0*	32,4	34,5
	14-5/6	5,0*	0	0,36*	20,3	6,5	10,4
Российская селекция	Екатерина	22,2	18,3	12,7	14,6*	21,7	23,9
	Тамбовский ранний	99,5*	20,8*	3,68*	10,8	33,7	10,8

* Самоопыление или близкородственное опыление.

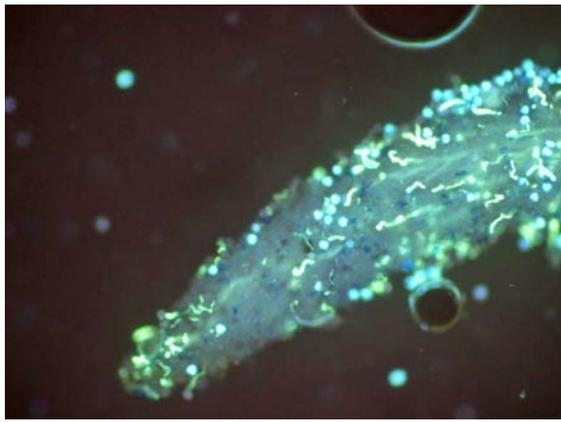


Рис. 4. Прорастание пыльцы фундука сорта Екатерина на верхней части пестика (люминесцентная микроскопия, увеличение – 10 × 10)

В то же время для сорта Тамбовский ранний отмечены очень высокие результаты прорастания пыльцы на рыльце пестика при близкородственных скрещиваниях и составляют 20,8–99,5 % (табл. 3).

Среднее количество пыльцевых зерен, прорастающих на рыльце пестика для сортов Яшма, Лал и Екатерина, близко по значению с результатами проращивания в чашках Петри (табл. 3).

Сравнительная оценка средних показателей процента прорастания пыльцевых зерен двумя методами (проращивание на пестике и в растворе сахарозы) показывает, что данные методы показательны и информативны (корреляция – 0,72). Степень согласования по средним величинам двух опытов представлена на рис. 5.

Процесс распускания женских соцветий показал, что пестики выходят из чешуй генеративной почки постепенно, выдвигаясь с набором суммы эффективных температур. Так, процесс полного выхода пестиков из почки может происходить до нескольких недель и, в условиях Беларуси, попадать под заморозки либо подсыхать от ветров. Возникает вопрос о продолжительности восприимчивости пестика к пыльце и эффективности опыления фундука.

Применение люминесцентной микроскопии показало, что характерной особенностью, обеспечивающей успешное опыление для фундука, является пестик, восприимчивый к пыльце по всей длине (рис. 6). Данная особенность позволяет воспринимать пыльцу в течение всего периода выдвижения пестика и при замерзании или засыхании верхних отрезков пестика использовать его основание. Это обеспечивает высокую потенциальную урожайность для культуры фундука, который цветет в период высокой вероятности возвратных заморозков, является диогамным, ветроопыляемым видом при выращивании в различных климатических условиях.

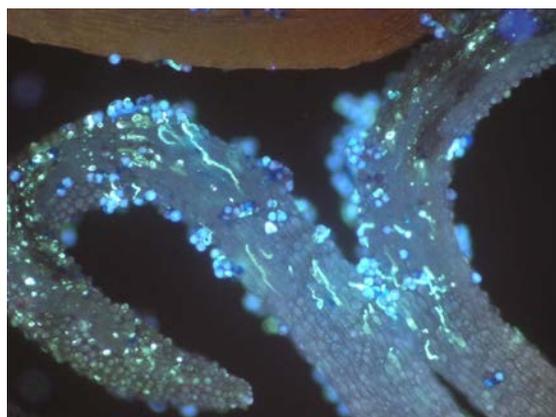


Рис. 6. Пестик фундука сорта Тамбовский ранний с пыльцевыми зёрнами, прорастающими в его верхней и средней части (люминесцентная микроскопия, увеличение – 10 × 10)

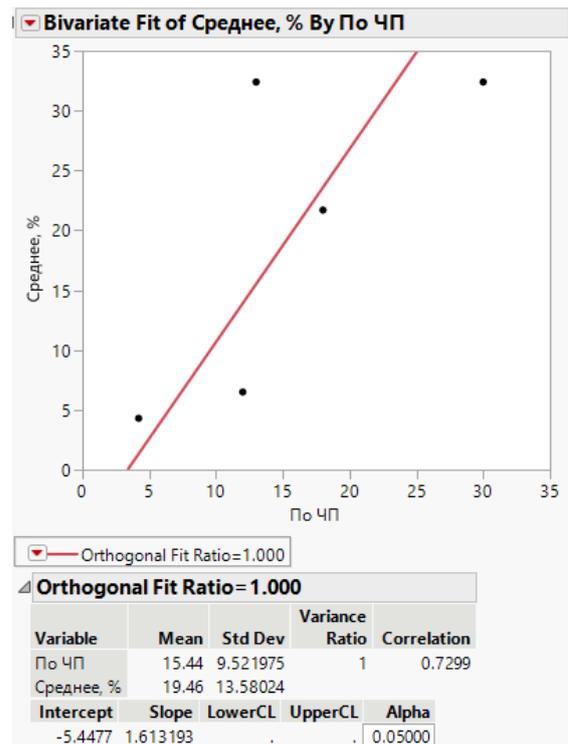


Рис. 5. Степень согласования по средним величинам двух методов исследования качества пыльцы (проращивание на пестике и в растворе сахарозы)

ВЫВОДЫ

В результате исследований установлено следующее:
высокое количество (93–99 %) окрашиваемых, хорошо выполненных пыльцевых зерен зафиксировано у большинства сортов фундука, за исключением сортов западноевропейской селекции;
стабильно высокое количество прорастающих в растворе сахарозы пыльцевых зерен характерно для сорта белорусской селекции Лал (41 и 30 %), сортов российской селекции Московский рубин (45 и 26 %) и Академик Яблоков (39 и 26 %);
отмечены меньшие показатели жизнеспособности, чем фертильности пыльцы, и отсутствие корреляции оценки ее качества двумя вышеприведенными методами;
наблюдаются значительные колебания жизнеспособности и фертильности пыльцы в зависимости от года исследований;
результаты оценки прорастания пыльцы на пестике методом люминесцентной микроскопии согласуются (корреляция – 0,72) с результатами проращивания в растворе сахарозы;
характерной особенностью, обеспечивающей успешное опыление для фундука, является пестик, восприимчивый к пыльце по всей длине.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Козловская, З. А. Лещина. Дикие виды и фундук / З. А. Козловская, Н. В. Луговцова // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Институт плодородства» ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 30. – С. 289–303.
2. Germain, E. The reproduction of hazelnut (*Corylus avellana* L.): a review / E. Germain // Acta Horticulturae. – 1994. – № 351. – P. 195–209.
3. Васильева, М. Н. Цитологические особенности признаков мужской стерильности гибридных сортов алычи культурной / М. Н. Васильева, В. А. Матвеев // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 1. – С. 84–89.
4. Воронова, О. Н. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе / О. Н. Воронова, В. А. Гаврилова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 180, № 1. – С. 95–104. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
5. Кудашева, Р. Ф. Разведение и селекция лещины и фундука / Р. Ф. Кудашева. – М. : Лес. пром-ть, 1965. – 131 с.
6. Zdyb, H. Leszczyna / H. Zdyb. – Warszawa : Powszechny Wydaw. Rol. i Lesne, 2010. – 249 s.
7. Mehlenbacher, S. A. Geographic Distribution of Incompatibility Alleles in Cultivars and Selections of European Hazelnut / S. A. Mehlenbacher // J. of the Amer. Soc. for Horticultural Sci. – 2014. – № 139 (2). – P. 191–212.
8. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений : учеб. пособие для аграр. специальностей / З. П. Паушева. – М. : Колос, 1970. – 255 с.
9. Kho, Y. O. Observing pollen tubes by means of fluorescence / Y. O. Kho, J. Baër // Euphytica. – 1968. – Vol. 17. – P. 298–302.
10. Comparison of ultrastructure, pollen tube growth pattern and starch content in developing and abortive ovaries during the progamic phase in hazel / J. Liu [et al.] // Frontiers in Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 528.
11. Литвак, А. И. Люминесцентная макро- и микроскопия в исследованиях плодовых культур и винограда / А. И. Литвак. – Кишинев : Штиинца, 1978. – 111 с.
12. Березенко, Н. П. Люминесцентный метод исследования роста пыльцевых трубок в тканях пестика некоторых сортов вишни / Н. П. Березенко // Цитолого-эмбриологические и генетико-биохимические основы опыления и оплодотворения растений : материалы Всесоюз. совещ., Ялта, 1980 г. / редкол.: В. П. Банникова (отв. ред.) [и др.]. – Киев, 1982. – С. 206–209.
13. Березенко, Н. П. Особенности формирования женского гаметофита у вишни и прорастание пыльцы при межвидовых реципрокных скрещиваниях ее с черешней / Н. П. Березенко // Цитология и генетика. – 1982. – № 1. – С. 32–37.

POLLEN QUALITY EVALUATION OF HAZELNUT GENOTYPES IN THE CONDITIONS OF BELARUS

N. V. LUGOVTSOVA, N. V. KUKHARCHIK, M. N. BORISENKO, V. V. VASEKHA, K. A. CHERNOOKAYA

Summary

Pollen quality of selected genotypes remains an essential aspect for breeding, development of new varieties and obtaining high-quality yield in the commercial orchards. This article presents the results of laboratory studies of pollen quality for 2020 and 2022. Fertility was determined by means of indigo carmine staining, viability was defined by the technique of germination on hanging drops of sucrose, germination on pistils pollinated in the laboratory was identified by fluorescence microscopy. Genotypes of different genetic origin were selected for the study: Western European and Russian varieties, Belarusian varieties and hybrids created at the RUE “Institute of Fruit Growing”. A comparative analysis of two methods is also presented; the germination of pollen on sucrose in petri dishes and on pistils.

Keywords: *Corylus avellana*, hazelnut, variety, hybrid, viability, pollen, pistil, light microscopy, fluorescent microscopy, artificial pollination, Belarus.

Поступила в редакцию 08.02.2023