

Кулян Раиса Васильевна, кандидат сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией селекции плодовых культур федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», г. Сочи; e-mail: supk-kulyan@vniisubtrop.ru;

Киселева Наталья Станиславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории селекции плодовых культур федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», г. Сочи; e-mail: nskiselyeva_05@mail.ru.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН КОЛЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ ЦИТРУСОВЫХ

(рецензирована)

В работе рассматривается применение анализа пыльцы 21 сортоформы рода *Citrus* – *C. limon*, *C. sinensis*, *C. paradisi* и *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. Ichangensis* по морфометрическим параметрам в селекционной практике. Установлено, что в условиях влажных субтропиков Краснодарского края наиболее фертильны формы: *C. paradisi* 'Azahican', *C. paradisi* Юбилейный, *C. limon* 'Del Brasil', *C. limon* Новозеландский, *C. bergamia* образуют от 50 до 85,7% функциональной пыльцы. По результатам кластерного анализа выявлены связи между комплексом признаков, и характерными отличиями *C. grandis* от *C. limon*.

Ключевые слова: цитрусовые, пыльцевое зерно, диаметр, жизнеспособность, длина пыльцевых трубок.

Kulyan Raisa Vasilievna, Candidate of Agricultural Sciences, head of the Laboratory of Fruit crops breeding of FSBSRI "All-Russian Scientific Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops", Sochi; e-mail: supk-kulyan@vniisubtrop.ru;

Kiseleva Natalia Stanislavovna, Candidate of Biology, a senior researcher of the Laboratory of Fruit crops breeding of FSBSRI "All-Russian Scientific Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops", Sochi; e-mail: nskiselyeva_05@mail.ru.

CHARACTERISTICS OF POLLEN GRAINS OF CITRUS COLLECTIVE FORMS

(Reviewed)

The article deals with the use of pollen analysis of 21 sort form of genus *Citrus* - *C. limon*, *C. sinensis*, *C. raradisi* and *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. Ichangensis* on morphometric parameters in breeding. It's been established that in the humid subtropics of the Krasnodar Territory the most fertile forms: *S. paradisi* 'Azahican', *S. paradisi* Jubilee, *C. limon* 'Del Brasil', *C. limon* Novozelansky, *C. bergamia* form from 50 to 85.7% of functional pollen. According to the results of cluster analysis relationships between complex of symptoms and characteristic differences of *C. grandis* and *C. limon* are revealed.

Keywords: citrus, pollen grain, diameter, vitality, length of pollen tubes.

В настоящее время в научных учреждениях России, и в том числе в ФГБНУ ВНИИЦиСК (Сочи) накоплен большой генофонд плодовых (груша, яблоня, слива), южных плодовых (киви, персик, унаби, гранат), субтропических (хурма, фейхоа, азимины), а также цитрусовых культур [1].

Одним из важнейших направлений использования коллекций растений является селекционное и производственное. Всестороннее изучение коллекционного материала направлено на эффективное вовлечение результатов исследований в целенаправленную селекцию и позволяет результативнее использовать различные генотипы, выделившиеся в результате исследований [2, 3].

ВНИИЦ и СК располагает обширной коллекцией цитрусовых культур, род цитрусовых объединяет большую группу разнообразных по своим свойствам и внешнему виду растений [4], ареал выращивания которых охватывает практически все страны тропического и субтропического пояса.

Большинство культивируемых видов цитрусовых плодоносят партенокарпически, и являются в основном стерильными. Причины стерильности кроются в наследственно обусловленной дегенерации мужских и женских органов цветка, вследствие чего у большинства форм отсутствует пыльца, и очень редко образуется фертильная способная к оплодотворению [5]. Иногда поведение растений значительно реформируются в зависимости от изменения условий внешней среды произрастания.

Таким образом, всестороннее изучение биологии и морфологии пыльцы коллекционных сортов цитрусовых позволит выделить лучшие формы для использования в селекционной работе, а также для более широкой характеристики интродуцированных сортов. Многими исследователями [6, 7] было отмечено возникновение аномальных пыльцевых зерен у интродуцентов, одной из причин нарушения развития генеративных органов растений является сама интродукция, т.е. смена природного ареала растений и особенно восприимчивы к этому пыльцевые зерна. Влияние условий интродукции на состояние пыльцевых зерен можно изучить при детальном сравнительном исследовании пыльцевых зерен интродуцированных растений.

Морфо-биометрические особенности пыльцевого зерна являются одним из важных биологических признаков сорта. От качества пыльцевого зерна зависят опыление цветка и процессы плодообразования, получение хорошо сформированных гибридных семян [8].

Пыльцевое зерно разных видов рода *Citrus* различается по форме, характеризуется качественными и количественными признаками.

В связи с этим основной задачей наших исследований является оценка особенностей прорастания пыльцевых зерен генотипов цитрусовых из коллекции ФГБНУ ВНИИЦиСК, степень изменчивости фенотипических признаков для характеристики сорта, формы и их использования в селекционной работе по синтезу новых сортов. Данные результаты, в дальнейшей селекционной работе, позволят упростить процесс выбора отцовских форм, а также позволят дать более полную характеристику коллекционным формам.

Материалы и методы исследований Коллекция цитрусовых культур ФГБНУ ВНИИЦиСК очень разнообразна, включает 132 таксона, которые культивируются в открытом и защищенном грунте. В коллекции представлены виды родов *Citrus* L., *Poncirus* Raf., *Fortunella* Sw., межродовые и межвидовые гибриды, различающиеся по географическому и генетическому происхождению, также дикорастущие формы устойчивые к стрессорам [9]. Охватить всю коллекцию цитрусовых достаточно сложно, поэтому мы остановились на 21 сортоформе рода *Citrus* - *C. limon*, *C. sinensis*, *C. paradisi* и *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. ichangensis*. Среди них имеются как фертильные, так и частично стерильные формы.

Цель работы – изучение морфологии пыльцы (форма, диаметр) и особенностей прорастания и длины пыльцевых трубок в искусственных условиях. Способность прорастания пыльцевых зерен изучалась на питательной среде, содержащей 1% агар-агара и 15% сахарозу с добавлением борной кислоты (0,006 %). Жизнеспособность определяли по проценту нормально проросших пыльцевых зерен, наблюдаемых в 5-10 полях зрения на микроскопе «Биолам-Л-211» (окуляр 7х, объектив 10х), цена деления окуляр-микрометра-10,6 мкм.

Работа проводилась в период с 2013 по 2015 год. Пыльцу заготавливали согласно методическим указаниям ВИР «Селекция цитрусовых» [9]. Жизнеспособность пыльцы определяли методом Транковского [10]. Полученные данные обрабатывали методами математической статистики [11], кластерный анализ проводили с использованием статистического программного пакета STAT по методу Уорда [12].

Результаты исследований

Пыльца цитрусовых липкая, желтого цвета, чем и обусловлен цвет пыльников у фертильных форм, тогда как у сортов с дефектной пылью, таких как, *C. sinensis* 'Washington Navel', 'Thompson Navel' и многих сортов *C. reticulata* var. *unshiu* пыльники имеют бледно-кремовую или белую окраску и обычно не растрескиваются.

Необходимо отметить что пыльца не образуется в одинаковом количестве во всех цветках, особенно малое количество образуется в начале цветения, это наблюдается во всех сортах и формах. Цветки сортов *C. limon*, *C. sinensis*, *C. aurantium* обладают минимальным количеством пыльцы, а цветки *C. paradisi*, *C. grandis*, *C. ichangensis* образуют большое количество пыльцы. У сортов *C. sinensis* пыльца встречается редко, обычно в конце цветения. Не выравненная пыльца отмечена у сортов *C. sinensis* – 'Salustiana', 'Valencia', *C. limon* 'Mayer', 'Новозеландский'.

Пыльцевые зерна цитрусовых округлые, широкоэллиптические, в пределах вида различаются по размеру, у *C. sinensis*, *C. limon* часто встречаются аномальные пыльцевые зерна более крупных размеров с нарушенной целостностью, но вполне жизнеспособны. Для большинства образцов характерны различия по диаметру пыльцевых зерен, что свидетельствует о больших наследственных различиях.

Согласно нашим экспериментальным исследованиям (рис. 1а), диаметр пыльцевого зерна генотипов цитрусовых различна – находится в пределах 32,7-87,2 мкм. Максимальным диаметром (87,2±мкм) характеризуются пыльцевые зерна *C. paradisi* 'Юбилейный' (87,2±мкм) *C. grandis* 'Sambokan' (82,2±мкм); минимальный отмечен – *C. aurantium* (32,7±мкм), остальные сорта разных видов занимают промежуточное положение (54,5±76,3мкм).

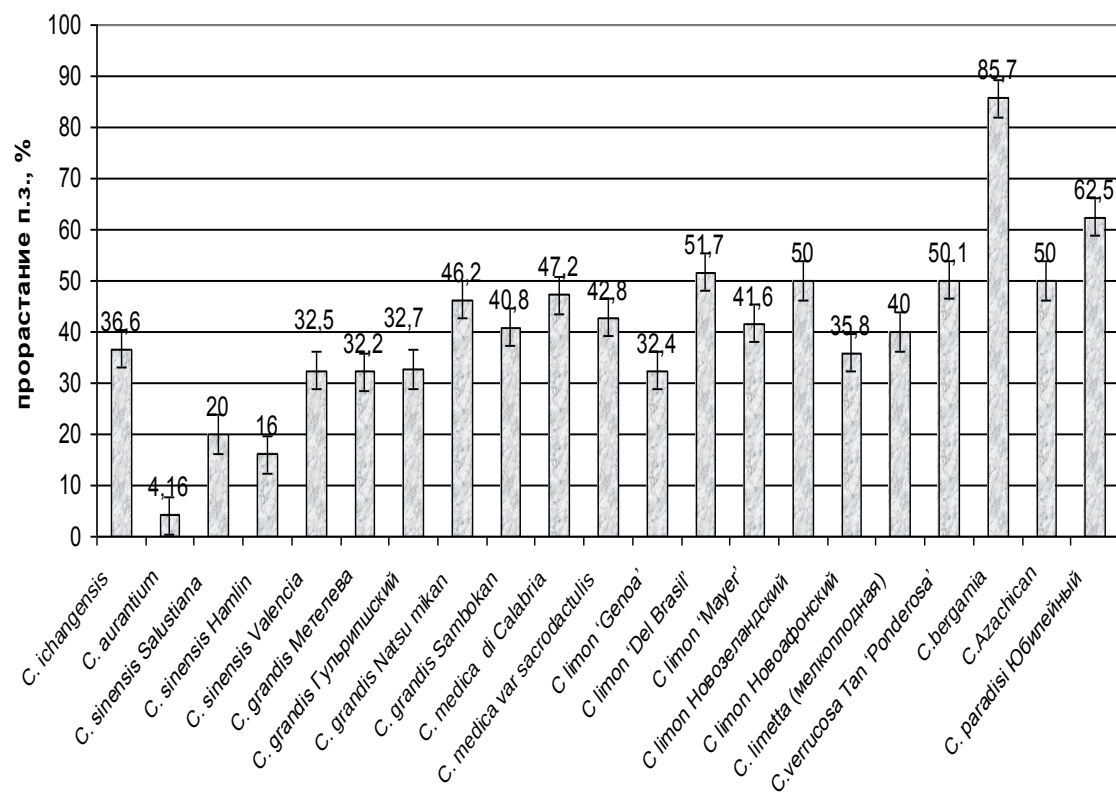
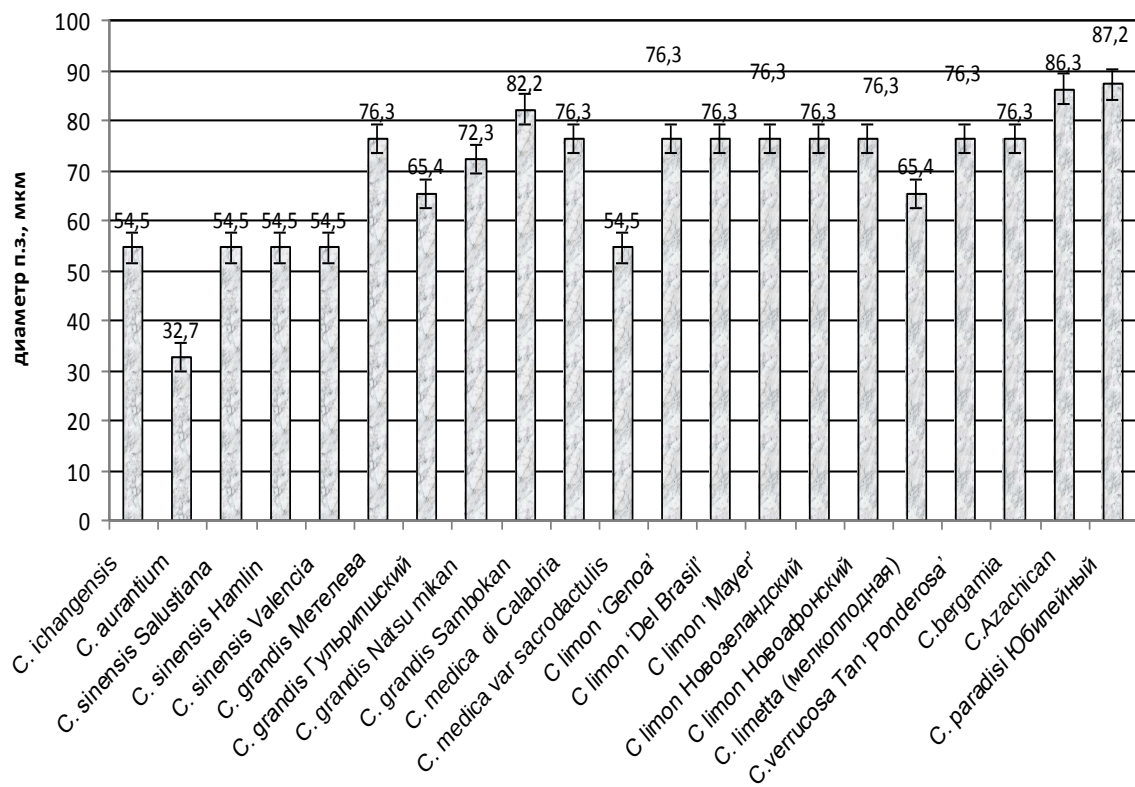
В результате изучения фертильности пыльцевых зерен генотипов цитрусовых оказалось, что сортам, как правило, присуща высокофертильная пыльца, с количественным варьированием от 32,2 до 62,5%. Максимальным количеством (85,7%) фертильной пыльцы характеризуется *C. bergamia* несколько более низким по сравнению с ним *C. paradisi* 'Юбилейный' (62,5%). Низкие показатели прорастания пыльцевых зерен отмечены *C. aurantium* (4,16%) и *C. sinensis* 'Hamlin' (16,0%) (рис. 1б).

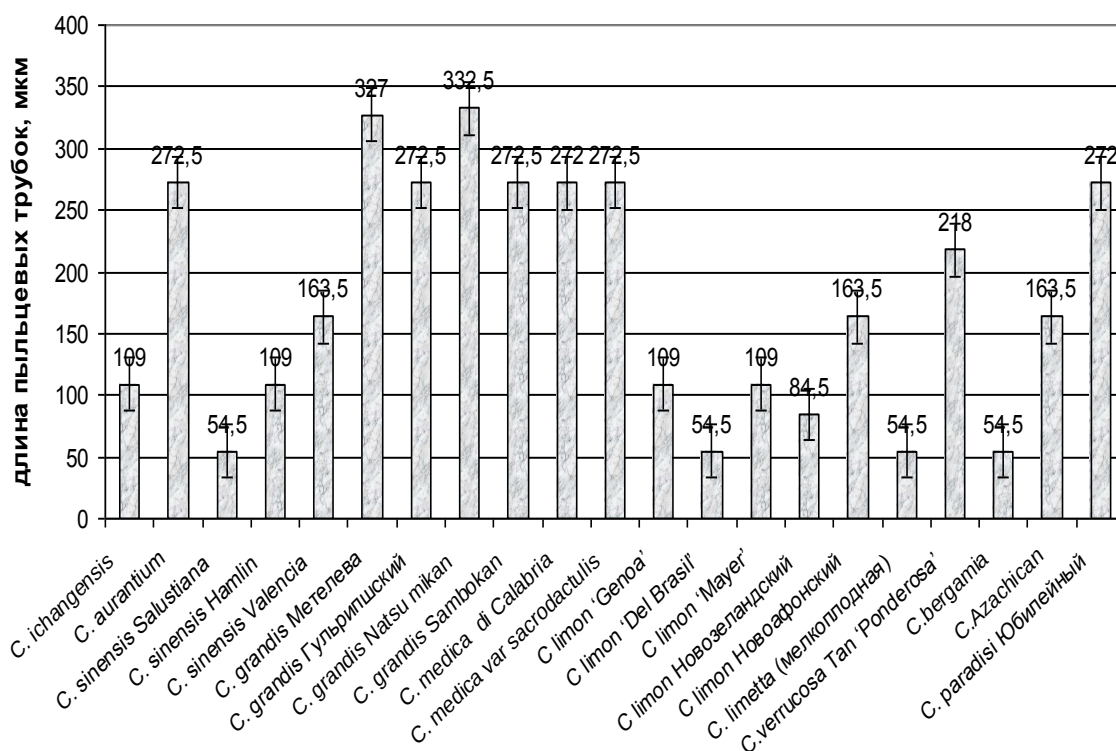
Необходимо отметить, что в условиях влажных субтропиков Краснодарского края наиболее фертильны формы: *C. paradisi* 'Azahican', *C. paradisi* 'Юбилейный', *C. limon* 'Del Brasil', *C. limon* 'Новозеландский', *C. bergamia* образуют от 50 до 85,7% функциональной пыльцы.

Длина пыльцевой трубки является одним из наиболее важных параметров в оплодотворении, поскольку именно от него зависит, произойдет ли оплодотворение. При искусственном опылении на рыльце пестика наносится значительное количество пыльцевых зерен, но в оплодотворении принимают участие только те из них, которые сформировали быстрорастущие пыльцевые трубки.

Установлены различия между некоторыми видами цитрусовых. Коллекционные формы можно разделить на три группы а) с короткой трубкой (54,5-84,5 мкм), к которым относятся: *C. sinensis* 'Salustiana', *C. bergamia*, *C. limon* 'Del Brasil' и *C. limon* 'Новозеландский'; б) средней (109 мкм – 163,5) – *C. ichangensis*, *C. limon* 'Genoa', *C. limon* 'Mayer', *C. sinensis* 'Valencia', *C. paradise* 'Azahican', *C. limon* 'Новоафонский'; г) максимально-длинной (218,0-272,5 мкм) – *C. aurantium*, *C. grandis*: 'Метелева', 'Гульрипшский' и др. (рис. 1в).

Для того, чтобы количественно оценить меру сходства коллекционных форм цитрусовых по комплексу из трех признаков и осуществить группировку растений по критерию максимального сходства по полученным данным был проведен кластерный анализ по методу Уорда. Кластеры формируются по критерию минимума внутри групповой дисперсии. Такой подход позволяет надеяться на выделение групп сортов, генетически сходных по признакам.





в)

Рисунок 1. Характеристика коллекционных форм цитрусовых по средним морфометрическим параметрам: а) диаметр пыльцевого зерна; б) процент прорастания пыльцевого зерна; в) длина пыльцевых трубок

В результате кластеризации сортообразцов выделено три кластера в следующем количественном составе: 1 кластер – 6 образцов (30,0%), 2 кластер – 7 (35,0%), 3 кластер – 7 (35,0%) (рис. 2).

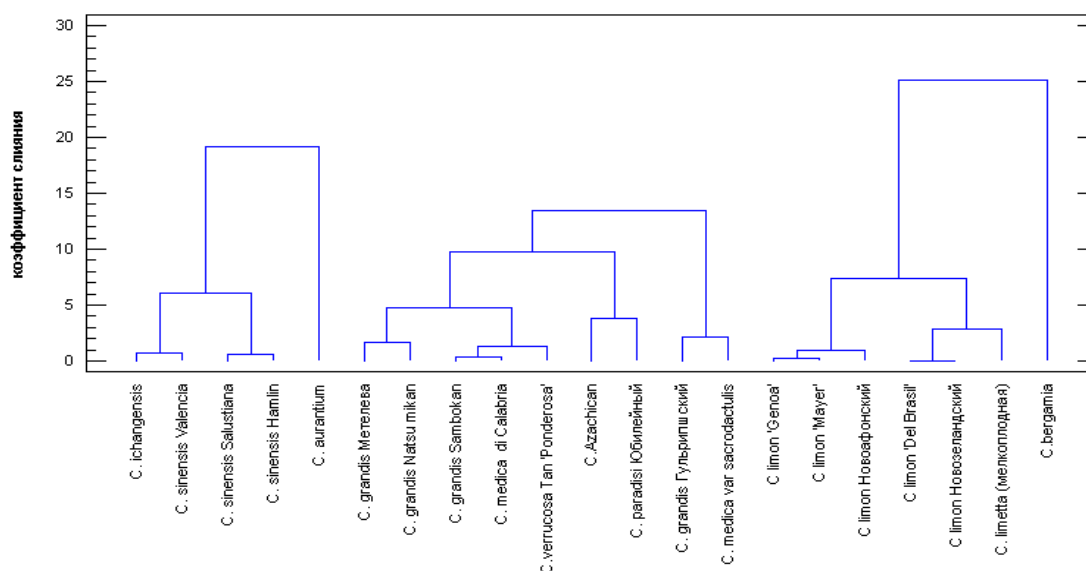


Рисунок 2. Дендрограмма сортообразцов цитрусовых (метод Уорда)

Правильность кластерного решения проверена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с фактором «кластер».

Выделенные 3 группы сортообразцов использовали в качестве градации фактора «кластер» в однофакторных дисперсионных комплексах, где в качестве варьирующего признака выступают такие показатели, как диаметр пыльцевых зерен, процент их прорастания, длина пыльцевых трубок. Результаты дисперсионных анализов приведены в табл. 1.

Таблица 1 - Дисперсионный анализ групп сортообразцов цитрусовых

Изменчивость	df	mS	F	Дисперсия	Доля от общей дисперсии, %
	<i>Диаметр пыльцевого зерна</i>				
Межгрупповая	2	1104,67	18,85**	17,43469	68,92664
Остаточная	17	58,5889	-	58,5889	31,07336
<i>Процент прорастания</i>					
Межгрупповая	2	1299,38	7,5*	168,9083	46,86426
Остаточная	17	173,325	-	173,325	53,13574
<i>Длина пыльцевой трубки</i>					
Межгрупповая	2	71026,6	22,94**	10189,58	72,96518
Остаточная	17	3096,06	-	3096,06	27,03482

Установлены статистически достоверные различия между группами по всем признакам. Средние по кластерам значения признаков, показавших статистически достоверные различия, представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Средние значения признаков в выделенных группах сортообразцов цитрусовых и результаты оценки достоверности их различий.

Кластер (группа)	Кол-во сорто-образцов	Диаметр пыльцевого зерна		Процент прорастания		Длина пыльцевой трубки	
		Среднее	Ранговый тест	Среднее	Ранговый тест	Среднее	Ранговый тест
1	6	50,5333	*	20,7767	*	127,167	*
2	7	71,9	*	41,7143	*	281,0	*
3	7	74,7429	*	48,1714	*	89,9286	*

Примечание. Расположение * на разных вертикалях рангового теста отражает статистически достоверные различия средних по кластерам.

Из табл. 2 видно, что средние значения в кластерах в достаточной степени различны.

Результаты всех трех дисперсионных анализов сортообразцов цитрусовых оказались положительными. Иными словами, в изучаемой группе выявились связи между комплексом, охарактеризованным 3-мя морфометрическими признаками пыльцы, и характерными признаками, отличающими *C. grandis* от *C. limon*.

Доля влияния фактора оказалась довольно велика во всех трех проведенных дисперсионных комплексах. Так, доля влияния фактора «кластер» при анализе признака «длина пыльцевой трубки» составила 72,9%, для признака «диаметр пыльцевого зерна» – 68,9% и для признака «прорастаемость» – 46,8%. Это обстоятельство представляется особенно важным. Можно сказать, что анализируемая группа перспективна для проведения соответствующих отборов по изучаемым признакам.

Таким образом, выявленные различия позволяют сделать описание каждого кластера по максимальному и минимальному значениям признака в группе:

Первый – объединяет сорта цитрусовых с невысоким процентом прорастанием пыльцевых зерен, минимальным диаметром пыльцы и средней длиной пыльцевых трубок и включает: *C. ichangensis*, *C. aurantium*, *C. Sinensis*: 'Salustiana', 'Hamlin', Valencia;

Второй кластер самый многочисленный который объединяет сорта видов *C. grandis*, *C. medica* данные формы обладают крупным диаметром пыльцевых зерен, длинными пыльцевыми трубками,

средним процентом прорастания. Сортоформы можно рекомендовать в качестве опылителей длинностолбчатых сортов.

Третий - характеризуется высоким процентом прорастания пыльцевых зерен но короткими пыльцевыми трубками и объединяет сорта и гибридные виды лимонной группы. *C. bergamia*, *C. limon* 'Genoa', *C. limon* 'Del Brasil', *C. limon* 'Mayer', *C. limon* 'Новозеландский', *C. limon* 'Новоафонский', *C. limetta*.

Полученное описание можно использовать для характеристики сортов при проведении селекционной работы и сортоизучения.

Литература:

1. Рындин А.В., Мохно В.С. Генетические ресурсы садовых растений в субтропиках России и возможности их использования // Субтропическое и декоративное садоводство. 2012. Т. 47, №2. С. 13-22.
2. Киселева Н.С. Изучение генофонда груши на Черноморском побережье Краснодарского края // Субтропическое и декоративное садоводство. 2004. Т. 39, №2. С. 535-546.
3. Омаров М.Д., Кулян Р.В. Создание новых форм хурмы восточной на Черноморском побережье Краснодарского края // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2015. №2. С. 23-26.
4. Рындин А.В., Кулян Р.В. Генетический потенциал современного сортимента цитрусовых на Черноморском побережье России // Вестник Россельхозакадемии. 2013. №6. С. 41-45.
5. Кулян Р.В. Оценка генофонда цитрусовых во влажных субтропиках России для создания новых форм мандарина: дис. ... канд. с-х. наук. Сочи, 2014. 193 с.
6. Цаценко Л.В., Нековаль С.Н. Пыльцевой анализ: монография. Краснодар: КубГАУ, 2012. 126 с.
7. Киселева Н.С. Взаимодействие влияния генотипа и внешних факторов среды на биологический потенциал сортов груши разных сроков созревания // Субтропическое и декоративное садоводство. 2012. Т. 46, №2. С. 63-71.
8. Кулян Р.В., Киселева Н.С. Морфометрическая оценка пыльцы основных опылителей цитрусовых в селекции *Citrus reticulata* // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 2016. №3. С. 43-46.
9. Селекция цитрусовых: методическим указаниям ВИР / Под ред. Е.Ф. Петровой. Ленинград, 1989. 19 с.
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биолог. спец. вузов. 4-е изд. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
12. Сажин Ю.В., Басов В.А. Многомерные статистические методы. Москва, 2002. 163 с.