

УДК 631.528:633.111

ДЛИНА ЗАМЫКАЮЩИХ КЛЕТОК УСТЬИЦ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ПЛОИДНОСТИ РАСТЕНИЙ TRITICUM AESTIVUM L., ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ

ХУ ДАОФЕНЬ, ЛИ ЧУНХОН, ЛЮ ДХАНПИН

(Пекинская лаборатория биоинженерии растительной клетки)

Доказана применимость метода, основанного на измерении длины замыкающих клеток устьиц (ДЗКУ), для идентификации степени ploидности растений мягкой озимой пшеницы, полученных методом культивирования пыльников. Установлена зависимость ДЗКУ от числа хромосом в кончике корня растений. Разность диплоидных и гаплоидных растений по данному признаку весьма существенна: ДЗКУ гаплоидов менее 60 мкм, диплоидов — более 70 мкм (стандарт для идентификации ploидности — 64 мкм). Надежность метода идентификации ploидности по ДЗКУ составляет около 90 % и не изменяется по годам. Во избежание искажения результатов измерений и для повышения точности метода растительные пробы необходимо брать с определенной части определенного листа.

Создание сортов растений с помощью культуры пыльников — новый метод селекции, разработанный в последние годы. Он позволяет не только сократить время, необходимое для выведения сорта, и повысить эффективность селекции, но и коренным образом влияет на генотипы комбинаций гамет и заключает в себе большие потенциальные возможности улучшения сортов. К настоящему времени методом пыльцегаплоидной селекции выведено несколько сортов пшеницы [2, 3]. Серьезным препятствием к более широкому применению данного метода служит низкая частота удвоения хромосом у гаплоидных растений, полученных способом культуры пыльников.

Для удвоения числа хромосом у гаплоидных растений часто используют колхицин и другие химические агенты. Но такая обработка приводит к гибели части растений, особенно таких, у которых уже произошло спонтанное удвоение хромосом. В силу данного обстоятельства химическим воздействиям часто предпочитают спонтанное удвоение хромосом, однако у озимой пшеницы частота получения диплоидных растений при этом не превышает 20—30 %. В результате многие гаплоиды не дают семян, что снижает эффективность селекционного процесса. Необходим поиск простого и быстрого метода идентификации ploидности растений, полученных при культивировании пыльников, чтобы иметь возможность отделить диплоиды от гаплоидов и затем обработать последние химическими агентами с целью

Статья представлена проф. Ю. Б. Коноваловым в рамках сотрудничества и обмена опытом.

увеличения популяции диплоидов.

Общепринятым методом определения плоидности растений в пыльцагаплоидной селекции является подсчет хромосом в давленных препаратах кончиков корня. Однако данная процедура сложна и трудоемка, поэтому большой интерес представляют попытки определения плоидности растений путем измерения длины замыкающих клеток устьиц (ДЗКУ) [1, 4, 6]. Указанный метод до сих пор использовался как вспомогательный, возможности его применения изучены недостаточно. Нами произведена попытка идентификации степени плоидности растений озимой мягкой пшеницы, полученных в культуре пыльников, путем измерения ДЗКУ.

Методика

Работа проводилась с сортом озимой мягкой пшеницы Jinghua 1, выведенным в нашей лаборатории методом культуры пыльников. Из пыльцы этого сорта в лабораторных условиях были получены растения-регенеранты, которые затем были высажены в теплице.

Число хромосом определяли обычным методом в давленных препаратах обрезанных кончиков корней. Одновременно небольшой кусочек нижнего эпидермиса, взятого с нижней части 2-го листа каждого из растений, помещали на предметное стекло микроскопа и проводили рендомизированно 30 измерений ДЗКУ с последующим определением средней величины. Таким же образом поступали с растениями 7 сортов мягкой озимой пшеницы, которые были выращены из семян в теплице при температурах от 7 °С до -7 °С зимой и не выше 30 °С летом.

Данные опытов были обработаны статистически [5]. Одной звездочкой отмечена достоверность различий при P_{05} , двумя — при P_{01} .

Результаты

Сравнение ДЗКУ диплоидов и гаплоидов. Осенью 1987 г. и весной 1988 г. было определено число хромосом у 105 растений сорта Jinghua 1, полученных культивированием пыльников. Результаты определений в обоих случаях совпадали: 80 растений (76,19 %) оказались гаплоидами ($n=21$) и 23 (21,90 %) — диплоидами ($2n=42$). Были обнаружены также 2 анеуплоида с числом хромосом, близким к 42. Все 23 диплоида и 2 анеуплоида, в отличие от 80 гаплоидов, дали семена: Это означает, что у гаплоидов после пересадки в теплицу не происходило спонтанного удвоения хромосом в течение зимы.

Среднее значение ДЗКУ 80 гаплоидов составило $55,75 \pm 4,42$ мкм при коэффициенте вариации 7,93 %. Распределение растений в зависимости от величины ДЗКУ приведено в табл. 1.

Среднее значение ДЗКУ 23 диплоидов равнялось $76,10 \pm 5,38$ мкм, коэффициент вариации — 7,08 % (табл. 2).

Статистическая обработка данных (t-тест) показала, что раз-

Таблица 1
Распределение пыльцагаплоидов в зависимости от значений ДЗКУ

Интервал класса, мкм	Количество	Частота, %
41,43—44,43	2	2,50
44,44—47,43	3	3,75
47,44—50,43	5	6,25
50,44—53,43	9	11,25
53,44—56,43	20	25,00
56,44—59,43	26	32,50
59,44—62,43	13	16,25
62,44—65,43	2	2,50
Σ	80	100,00

Таблица 2
Распределение пыльцедиплоидов в зависимости от значений ДЗКУ

Интервал класса, мкм	Количество	Частота, %
66,73—70,73	2	8,70
70,74—74,73	8	34,78
74,74—78,73	8	34,78
78,74—82,73	2	8,70
82,74—86,73	1	4,35
86,74—90,73	2	8,70
Σ	23	100,00

ность ДЗКУ гаплоидов и диплоидов весьма существенна ($t=18,4^{**}$).

С осени 1988 г. до весны 1989 г. была проведена еще одна серия измерений. Из 33 растений сорта Jinghua 1, полученных в культуре пыльников, гаплоидов оказалось 26 (78,79 %) и диплоидов 7 (21,21 %) при средних значениях ДЗКУ диплоидов $74,68 \pm 2,21$ мкм, гаплоидов — $55,54 \pm 3,56$ мкм и весьма существенной разности их по данному признаку ($t=13,4^{**}$). Значения ДЗКУ растений одной степени плоидности по годам изменялись несущественно: t для гаплоидов равнялось 0,2, для диплоидов — 0,7. Это свидетельствует о постоянстве значений ДЗКУ и зависимости данного признака главным образом от степени плоидности растений.

Сравнение ДЗКУ различных листьев одного и того же растения. У 54 пыльцагаплоидных растений Jinghua 1 измеряли ДЗКУ 2-го и 5-го листа. Среднее значение ДЗКУ равнялось соответственно $55,45 \pm 4,31$ и $52,08 \pm 3,61$ мкм при высокозначимой разности ($t=4,4^{**}$).

Аналогичные измерения ДЗКУ у 23 диплоидных растений также подтвердили значительную изменчивость данного признака в пределах одного и того же растения в зависимости от места отбора проб ($t=4,0^{**}$).

Сравнение ДЗКУ различных частей листа. Лист был разделен на три части: верхнюю, среднюю и нижнюю. Измерение ДЗКУ у 13 растений Jinghua 1, выращенных из семян, дало следующие результаты: верхняя часть листа — $65,45 \pm 5,46$ мкм при коэффициенте вариации $v=8,36$ %, средняя часть — $68,72 \pm 6,35$ мкм ($v=9,25$ %), нижняя — $71,31 \pm 4,28$ мкм ($v=6,01$ %). Статистическая обработка (F-тест) показала, что разность ДЗКУ частей листа по этому показателю существенна ($F=4,0^{*}$). В наименьшей степени варьирует ДЗКУ нижней части листа, о чем свидетельствует самое низкое значение коэффициента вариации. Следовательно, для измерений следует брать именно эту часть листа.

Корреляция между площадью листа и ДЗКУ. В табл. 3 приведены результаты измерений площади листа и ДЗКУ 20 диплоидных растений сорта Jinghua 1, полученных в культуре пыльников. Корреляционный анализ не обнаружил какой-либо существенной связи между этими признаками ($r=-0,22$). Не выявлено существенной корреляции между площадью листа и ДЗКУ 60 пыльцагаплоидов Jinghua 1 ($r=0,25$). Это показывает, что для измерений ДЗКУ могут быть использованы листья различных размеров.

Сравнение ДЗКУ различных сортов. Результаты измерений ДЗКУ у растений 3 диплоидных сортов, полученных методом культуры пыльников (Jinghua 2, Jinghua 3 и Jinghua 5), и у 3 обычных диплоидных сортов (1429, 7016 и 8187) приведены в табл. 4. Статистическая обработка (F-тест) выявила весьма существенные различия между исследованными 6 сортами по данному признаку ($F=$

Таблица 3
Площадь листа и ДЗКУ диплоидных растений, полученных в культуре пыльников

Листья			ДЗКУ, мкм
Ширина, см	Длина, см	Площадь*, см ²	
0,30	7,3	2,19	75,41
0,40	5,5	2,20	71,48
0,25	8,9	2,23	75,46
0,30	8,2	2,46	74,16
0,35	8,2	2,87	71,48
0,40	9,0	3,60	78,45
0,40	9,4	3,76	87,14
0,40	11,2	4,48	82,73
0,50	10,1	5,05	71,71
0,40	12,9	5,16	83,32
0,45	11,8	5,31	80,82
0,40	14,4	5,76	78,27
0,60	10,5	6,30	73,32
0,65	15,3	9,95	75,65
0,70	16,0	11,20	88,93
0,70	17,0	11,90	74,82
0,75	17,3	12,98	69,70
0,70	18,6	13,02	76,00
0,80	18,6	14,88	66,73
0,95	21,3	20,24	73,21

* Ширина, умноженная на длину.

=3,5**). В то же время разность значений ДЗКУ некоторых сортов была несущественной.

Сравнение ДЗКУ родительских сортов и их гибридного потомства. Этот показатель у гибридов был больше, чем у родительских сортов. Так, средние значения ДЗКУ пыльцедиплоидных гибридных растений (комбинация 1429 × Jingdan 84) равнялась $77,91 \pm 4,19$ мкм, родительских сортов — соответственно $70,21 \pm 4,66$ и $68,66 \pm 3,23$ мкм (табл. 5). Это может быть связано с гетерозисным ростом в F₁, что подтверждается наличием сходных тенденций в изменении зна-

Таблица 4
Сравнение ДЗКУ различных сортов пшеницы

Сорт	Средняя длина, мкм	Разность, мкм
Jinghua 5	$75,71 \pm 1,15$	
Jinghua 2	$73,96 \pm 1,82$	1,75
81-87	$72,85 \pm 2,68$	2,86* 1,11
7016	$72,84 \pm 3,71$	2,87 1,12 0,01
Jinghua 3	$72,53 \pm 3,02$	3,18* 1,43 0,32
		0,31
1429	$70,21 \pm 4,66$	5,50* 3,75**
		2,64 2,63 2,32

Таблица 5
Сравнение ДЗКУ гибридов и родительских сортов

Гибридные комбинации и родительские сорта	Средняя длина, мкм	Значение t
1429 × Jingdan 84	$77,91 \pm 4,19$	
♀ 1429	$70,21 \pm 4,66$	3,9**
♂ Jingdan 84	$68,66 \pm 3,23$	5,5**
Jingdan 84 × Jingshuang 12	$76,88 \pm 2,83$	
♀ Jingdan 84	$68,66 \pm 3,23$	5,9**
♂ Jingshuang 12	$74,48 \pm 2,87$	1,8
Nongda 142 × Jingdan 16	$76,18 \pm 6,88$	
♀ Nongda 142	$67,66 \pm 3,14$	3,4**
♂ Jingdan 16	$72,58 \pm 2,30$	1,5

чений других признаков. Характерно, что ДЗКУ диплоидных растений, полученных методом культивирования пыльников, больше, чем у диплоидных растений того же сорта, выращенных из семян. Например, для сорта Jinghua 1 эти величины равнялись $76,10 \pm 5,38$ и $71,31 \pm 4,28$ мкм соответственно, причем разность их весьма существенна ($t=2,7**$). Генетическая природа ДЗКУ должна быть предметом дальнейшего изучения.

Обсуждение результатов

Результаты данных опытов показали, что доверительный интервал

значений ДЗКУ пыльцагаплоидов Jinghua 1 составляет 46,96—65,54 мкм, диплоидов — 64,93—87,27 мкм при уровне значимости 0,05. Разница вполне очевидна, поэтому значение ДЗКУ 64 мкм может быть принято в качестве стандартного для идентификации пloidности. Чтобы убедиться в этом, в 1989 г. были проведены измерения ДЗКУ у более чем 2000 растений озимой пшеницы, полученных методом культуры пыльников (H_1), и их пloidность была идентифицирована путем сопоставления ДЗКУ со стандартом. Точность определения составила 91,61 %. При идентификации пloidности растений других сортов и гибридов путем сопоставления ДЗКУ со стандартом, разработанным для сорта Jinghua 1, возможны некоторые неточности. Однако, несмотря на то, что точность определения пloidности по ДЗКУ может зависеть от сортовой принадлежности растения, уровень ее выше 90 % вполне достижим. Это означает, что стандартное для сорта Jinghua 1 значение ДЗКУ может быть использовано и для других сортов и гибридов.

Во избежание ошибок при идентификации пloidности растений, полученных методом культуры пыльников, необходимо отбирать для измерений ДЗКУ одни и те же части одних и тех же листьев.

Описанный здесь способ идентификации пloidности растений, полученных методом культуры пыльников, значительно проще, чем подсчет числа хромосом в давленных препаратах. Однако данный метод применим исключительно для идентификации пloidности и неприго-

ден для выявления каких-либо мелких изменений в хромосомном наборе. В данном эксперименте среди исследованных растений у 2 в давленных препаратах кончиков корней были идентифицированы телохромосомы. При этом ДЗКУ указанных растений находилась в пределах, характерных для нормальных диплоидов (77,38 и 79,21 мкм). Следовательно, отличить анеуплоиды от нормальных диплоидов путем измерений ДЗКУ невозможно. Данный метод неприменим также для выявления миксопloidии, особенно если число образцов невелико. В этом случае предпочтителен метод давленных препаратов.

Заклучение

Предложен простой и быстрый метод идентификации пloidности растений озимой пшеницы, полученных методом культивирования пыльников. Он дает точные и стабильные результаты и позволяет отобрать гаплоиды, у которых отсутствует спонтанное удвоение числа хромосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cai Wenxia* e. a.— Botany J., 1980. N 10.— 2. *Hu Daofen* e. a.— Scientia Sinica Ser. B, 1986, vol. 29, N 7, p. 733—745.— 3. *Li Meifang* e. a.— Acta Crop, 1983, vol. 9, N 3, p. 173—179.— 4. Symposium on Haploid breeding. Tobacco Institute Sinica.— Science Press, 1974, vol. 2, p. 26—38.— 5. *Tong Yizhong*.— The Common Statistics Anylysis in Crop Breeding. Shanghai Science and Technology Press, 1979.— 6. *Wang Pei* e. a.— Acta Agriculture Boreali—Sinica, 1989, vol. 4, N 3, p. 6—10.

Статья поступила 15 декабря 1990 г.