

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

На правах рукопису

**ТОЦЬКИЙ ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ**

УДК 575:581.1:633.854.78

**ВПЛИВ МІКРОГАМЕТОФІТНОГО ДОБОРУ В F<sub>1</sub> НА ГЕНЕТИЧНУ  
СТРУКТУРУ ПОПУЛЯЦІЙ F<sub>2</sub> ТА ЇХ СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ  
СТРЕСІВ У СОНЯШНИКА КУЛЬТУРНОГО  
(*HELIANTHUS ANNUUS*L.)**

03.00.15 – генетика

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Лях Віктор Олексійович

Доктор біологічних наук, професор

Запоріжжя – 2015

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....  | 4  |
| ВСТУП.....  | 5  |
| РОЗДІЛ 1. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ГАМЕТОФІТНОГО ДОБОРУ<br>У СОНЯШНИКА КУЛЬТУРНОГО ( <i>HELIANTHUS ANNUUS L.</i> ).....                   | 11 |
| 1.1. Вимоги соняшника до умов зростання.....  | 11 |
| 1.2. ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ СЕЛЕКЦІЇ СОНЯШНИКА НА СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ<br>ФАКТОРІВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....                              | 12 |
| 1.3. ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ ГАМЕТОФІТНОЇ СЕЛЕКЦІЇ.....   | 16 |
| 1.4. ПРАКТИЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОБОРУ ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ НА РІВНІ ПИЛКУ.....   | 22 |
| РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....  | 38 |
| 2.1. Ґрунтово-метеорологічні умови.....   | 38 |
| 2.2. МАТЕРІАЛ.....  | 41 |
| 2.3. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....  | 45 |
| РОЗДІЛ 3. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ЖАРОСТІЙКІСТЬ.....  | 59 |
| 3.1. СТІЙКІСТЬ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР.....   | 59 |
| 3.2. ВПЛИВ ПРОГРІВАННЯ ПИЛКУ СОНЯШНИКА НА ЙОГО ПРОРОСТАННЯ НА<br>ШТУЧНОМУ СЕРЕДОВИЩІ.....   | 63 |
| 3.3. ВПЛИВ ПРОГРІВАННЯ ПИЛКУ ГІБРИДІВ $F_1$ НА ГЕНЕТИЧНУ СТРУКТУРУ<br>ПОПУЛЯЦІЙ $F_2$ ТА ЇХ СТІЙКІСТЬ ДО ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР.....          | 65 |
| РОЗДІЛ 4. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ.....  | 84 |
| 4.1. СТІЙКІСТЬ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ПОСУХИ.....   | 84 |
| 4.2. ВПЛИВ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ НА ПРОРОСТАННЯ ПИЛКУ СОНЯШНИКА.....   | 85 |
| 4.3. ВПЛИВ ПРОРОСТАННЯ ПИЛКУ ГІБРИДІВ $F_1$ ПІД ВПЛИВОМ ОСМОТИКА НА<br>ГЕНЕТИЧНУ СТРУКТУРУ ПОПУЛЯЦІЙ $F_2$ ТА ЇХ СТІЙКІСТЬ ДО ПОСУХИ..... | 87 |
| РОЗДІЛ 5. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ХОЛОДОСТІЙКІСТЬ.....  | 95 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.1. Стійкість вихідного матеріалу до низьких температур.....   | 95  |
| 5.2. Вплив витримування пилку соняшника при низькій температурі на його проростання на штучному середовищі.....                             | 98  |
| 5.3. Вплив витримування пилку гібридів $F_1$ при низьких температурах на генетичну структуру популяцій $F_2$ та їх стійкість до холоду..... | 100 |
| РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....  | 108 |
| ВИСНОВКИ.....   | 114 |
| РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ.....  | 116 |
| ДОДАТОК А.....  | 117 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....   | 118 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІОК НААН – Інститут олійних культур Національної академії аграрних наук України.

ВНДІСНОК – Всеросійський науково-дослідний інститут селекції та насінництва овочевих культур.

ПЕГ 6000 – поліетиленгліколь з молекулярною масою  $M=6000$ .

$\chi^2$  – критерій  $\chi^2$ .

$t$  – критерій достовірності Стюдента.

$df$  – кількість ступенів свободи.

$p$  – рівень значущості.

\*, \*\*, \*\*\* (#, ##, ###) – достовірно при рівні значущості 0,05 (95%), 0,01 (99%), 0,001 (99,9%) відповідно.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Соняшник – основна олійна культура України. Його вирощування економічно вигідно. У кінці 2000-х років середній показник урожайності соняшнику в Україні перевищив 1,50 т/га. Можливе отримання врожаю до 3,6 т/га. Один гектар посіву при врожаї насіння 25 ц/га дає 1200 кг масла, 800 кг шроту, 500 кг лузги, 1500 кг кошиків, 25-30 кг меду та іншої продукції. Олія та насіння використовуються в харчовій промисловості, при виробництві мила, оліфи, лінолеуму та інших виробів [1, 2].

У південних регіонах України соняшник постійно піддається впливу спеки та посухи, що значно знижує його продуктивність і не дає можливості повністю реалізувати потенціал врожайності [3, 4]. Вирощування соняшнику в північних регіонах України та інших держав не вигідно через вплив низьких температур, які також значно знижують врожайність [3, 5]. Таким чином, проведення добору на стійкість до абіотичних факторів середовища є важливим завданням в селекції соняшнику і невід'ємною умовою реалізації потенційної продуктивності сучасних та перспективних сортів та гібридів соняшника.

Посуха – один з найбільш комплексних і руйнівних в глобальному масштабі абіотичних стресів. Збиток від неї перевищує збиток від будь-якого іншого стресора. Тільки одна посуха може скоротити врожай на 15-50% [6]. Слід зазначити, що на дефіцит води негативно реагують будь-які рослини (у тому числі «посухостійкі»), і в кожній з них дефіцит води знижує продуктивність. Зазвичай в умовах півдня України посуха та високі температури комплексно впливають на рослини, що лише підвищує негативні наслідки від дії абіотичних стресів. Високі температури, що діють у південних регіонах України, можуть значно перевищувати оптимальні для соняшника, особливо на рівні кошика, що постійно знаходиться під впливом сонячних променів. Можливі глобальні кліматичні зміни в майбутньому передбачають збільшення ризику виникнення посухи та поступове підвищення температури [6]. Соняшник є теплолюбною рослиною та погано переносить весняні заморозки, що дуже сильно обмежує ареал його вирощування. Підвищені та

понижені температури також значно зменшують продуктивність соняшника. У всіх випадках мова йде про необхідність пом'якшення негативного впливу абіотичного стресу на врожай.

Якщо селекційні роботи зі збільшення жаростійкості та посухостійкості соняшнику ведуться у досить широких масштабах, то аналогічні дослідження зі збільшення холодостійкості практично не реалізуються [4].

В основному, селекція соняшнику ведеться традиційними методами і об'єктом добору є спорофітне покоління в життєвому циклі рослини. Разом з тим, існує можливість проведення селекції на стійкість до абіотичних факторів середовища і на гаметофітному етапі життєвого циклу. Дослідження із застосування гаметофітного добору у соняшнику практично не проводяться. Однак у інших культур цей метод вже успішно використовується [7-20].

Встановлено, що більша частина структурних генів, які експресуються в пилку, експресуються також і в спорофіті [21, 22]. Це дозволяє проводити добір цінних генотипів на рівні гамет. Перевагою цього добору є мікроскопічний розмір пилку і гаплоїдний стан її генотипу, що забезпечує експресію генів, у тому числі рецесивних, багато з яких якраз і обумовлюють господарську цінність культурних рослин. До безумовних переваг пилкової селекції слід віднести не тільки залучення до штучного добору величезної кількості генотипів, але й можливість регулювати «жорсткість» добору в умовах, які суворо контролюються [23].

Селекція на підвищення жаростійкості, посухостійкості та, особливо, холодостійкості дозволить зменшити негативний вплив абіотичних стресів на врожай соняшника та збільшити ареал вирощування соняшника культурного. Таким чином, проведені нами роботи з гаметофітного добору є досить актуальними для сьогоденної селекції соняшника культурного та дозволяють за рахунок використання пилкової селекції прискорити створення стійких до різних абіотичних стресів сортів та гібридів соняшника культурного.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження за темою дисертації виконані у 2011-2015 роках відповідно до тематичного плану науково-дослідної роботи кафедри садово-паркового

господарства та генетики рослин Запорізького національного університету за темою «Збільшення генетичної мінливості сільськогосподарських і декоративних рослин з використанням сучасних методичних засобів та пошук нових генетичних джерел продуктивності та якості продукції» (№ державної реєстрації — 0110U004790).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дослідження було вивчення впливу пилкового добору у гібридів  $F_1$  соняшнику культурного на стійкість популяцій  $F_2$  до абіотичних факторів зовнішнього середовища та їх генетичну структуру.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- дослідити жаростійкість, посухостійкість та холодостійкість вихідних ліній соняшника культурного;
- одержати гібриди між лініями соняшника, контрастними за стійкістю до різних абіотичних стресів;
- визначити жорсткість добору для проведення гаметофітної селекції шляхом впливу різних абіотичних стресів на життєздатність пилку гібридів  $F_1$  соняшника;
- провести гаметофітний добір на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища у гібридів  $F_1$  соняшника культурного та отримати насіння  $F_2$ ;
- оцінити популяції  $F_2$  на стійкість до абіотичних стресів;
- провести гібридологічний аналіз та вивчити структуру популяцій  $F_2$  за маркерними ознаками;
- вивчити структуру популяцій  $F_2$  за деякими кількісними ознаками рослин.

*Об'єкт дослідження:* генетична мінливість у гаметофітному та спорофітному поколіннях у соняшника культурного (*Helianthus annuus* L.).

*Предмет дослідження:* управління формоутворювальним процесом за рахунок зв'язку між чутливістю гаметофіту та стійкістю спорофіту до абіотичних стресів.

*Методи дослідження:* штучна гібридизація; методи гаметофітного добору; методи визначення посухостійкості, жаростійкості та холодостійкості вихідного матеріалу та популяцій F<sub>2</sub>; пророщування пилку *in vitro*; світлова мікроскопія для визначення життєздатності пилку; вегетаційний дослід в умовах фітотрону; польовий експеримент; гібридологічний аналіз. Достовірність відмінностей оцінювали за методом  $\chi^2$  та t-критерієм Стьюдента.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено дослідження впливу гаметофітного добору у гібридів F<sub>1</sub> соняшника культурного на стійкість популяцій F<sub>2</sub> до абіотичних стресів та структуру цих популяцій за морфологічними якісними (маркерними) ознаками.

Встановлено, що прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> збільшує не тільки жаростійкість, але і посухостійкість та адаптаційні властивості популяцій спорофітів F<sub>2</sub>, а також змінює генетичну структуру цих популяцій за висотою рослин.

Виявлено, що запилення свіжозібраним пилком гібридів F<sub>1</sub> суцвіть, змочених осмотично активною речовиною, збільшує посухостійкість популяцій спорофітів F<sub>2</sub>, а також змінює генетичну структуру цих популяцій за маркерною ознакою «*virescent*», що є хлорофільною мутацією.

Визначено, що витримування пилку гібридів F<sub>1</sub> при понижених температурах протягом 8 діб збільшує холодостійкість популяцій спорофітів F<sub>2</sub>, а також змінює генетичну структуру популяцій F<sub>2</sub> за маркерними ознаками «дихотомічне жилкування» та «карлик».

Вперше встановлено зв'язок між генами, що контролюють маркерні ознаки «*virescent*», «дихотомічне жилкування» та «карлик» з генами, що детермінують стійкість соняшника до абіотичних стресів.

Доведено ефективність проведення гаметофітного добору у гібридів F<sub>1</sub> для збільшення стійкості популяцій F<sub>2</sub> соняшника культурного до абіотичних факторів зовнішнього середовища.

Новизна розробленого способу гаметофітного добору на жаростійкість підтверджена патентом України на винахід.

**Практичне значення одержаних результатів.** Для добору жаростійких генотипів соняшника пропонується витримування гетерогенної популяції пилку при температурі  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 1-ї та 3-ох годин. При цьому збільшується не тільки стійкість до високої температури, але і покращуються посухостійкість та, в цілому, адаптаційні властивості популяцій рослин.

Пропонується нанесення на приймочки квіток перед їх запиленням осмотично активної речовини, у якості якої виступає 10%-вий розчин ПЕГ 6000, для добору посухостійких генотипів соняшника.

Рекомендовано для добору холодостійких генотипів соняшника витримувати гетерогенну популяцію пилку при  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 8 діб.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Пошук інформації серед вітчизняних та зарубіжних літературних джерел, проведення експерименту, статистичну обробку експериментальних даних та інтерпретацію результатів здійснено особисто здобувачем.

Спільно з науковим керівником обрано об'єкти та методи досліджень, складено схему дослідження та обговорено одержані дані.

Роль автора у виконанні експериментальних робіт полягала у проведенні оцінки вихідних ліній соняшника культурного у лабораторних умовах на стійкість до абіотичних стресів, одержанні міжлінійних гібридів, пророщуванні *in vitro* пилку гібридів  $F_1$  під впливом різних абіотичних факторів, проведенні гаметофітного добору у гібридів першого покоління, проведенні оцінки популяцій  $F_2$  у лабораторних та польових умовах на стійкість до абіотичних стресів, проведенні маркерного аналізу популяцій  $F_2$ , проведенні аналізу структури популяцій  $F_2$  за кількісними ознаками.

Публікації підготовлені як самостійно, так і у співавторстві. Внесок здобувача в публікаціях, виконаних у співавторстві, полягає у проведенні експерименту, аналізі та узагальненні результатів досліджень і складає 80%.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи було представлено на III Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запоріжжя, 2013), II Регіональній науково-практичній

конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук» (Запоріжжя, 2013), III Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014), VI з'їзді Вавіловського товариства генетиків і селекціонерів (ВТГіС) та асоційованих генетичних симпозіумах (Ростов-на-Дону, 2014), Міжнародній науково-практичній конференції «Стійкість соняшнику до біо- та абіотичних чинників» (Харків, 2014), Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 2014), III Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених з всеукраїнською участю «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук» (Запоріжжя, 2014), IV Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2015).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць. В тому числі 4 статті у фахових виданнях України, 2 статті у зарубіжних журналах, що входять до наукометричної бази SCOPUS, 9 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій. Одержано патент України на винахід (№ 108818).

**Структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 133 сторінках друкованого тексту, містить 35 таблиць, 14 рисунків, 1 додаток і складається з переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, розділу «умови, матеріал і методи досліджень», трьох експериментальних розділів, розділу «аналіз і узагальнення одержаних результатів», висновків, рекомендацій селекційній практиці і списку використаних джерел. Список використаної літератури нараховує 150 найменувань, у тому числі 65 латиницею.

# РОЗДІЛ 1. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ГАМЕТОФІТНОГО ДОБОРУ У СОНЯШНИКА КУЛЬТУРНОГО (*HELIANTHUS ANNUUS L.*)

## 1.1. Вимоги соняшника до умов зростання

Культурний соняшник (*Helianthus annuus L.*) належить до підкласу астеріди – *Asteridae*, порядку складноцвітих – *Asterales*, сімейства айстрових – *Asteraceae*, роду *Helianthus L.* Це поліморфний рід, що включає від 10 до 254 видів. Відповідно до класифікації А.В. Анащенко рід *Helianthus* включає один однорічний вид (з 3 підвидами) і 9 багаторічних (з 13 підвидами). Ф. Венцлавовіч і А.В. Анащенко розробили внутрішньовидову класифікацію культурних форм соняшнику *Helianthus annuus L. subsp. annuus*. Олійний соняшник відноситься до *subsp. annuus, var pustovojtii Anashz.* [24, 25].

Соняшник ( $2n = 34$ ) дуже вимогливий до кліматичних умов. Ця рослина є теплолюбною. Мінімальна температура проростання —  $5^{\circ}\text{C}$ , при посіві температура ґрунту повинна бути не нижче  $6-8^{\circ}\text{C}$ . Мінімальна сума ефективних температур для ранньостиглих сортів і гібридів, що мають тривалість вегетаційного періоду близько 150 днів, становить  $1450^{\circ}\text{C}$ , тобто починаючи з другої половини травня середня температура повинна бути  $15^{\circ}\text{C}$ . Температура зазвичай має становити не нижче  $6^{\circ}\text{C}$ . Фотосинтез найбільш ефективно відбувається при температурі  $25^{\circ}\text{C}$ . Сходи переносять пізні заморозки до  $-5^{\circ}\text{C}$ . Соняшник не доцільно вирощувати у районах з частими весняними заморозками та у регіонах, де не забезпечується прибирання до кінця вересня [3].

Соняшник є мезофітом, але він дуже вибагливий до наявності вологи. Саме тому врожайність і ефективність його вирощування обмежуються забезпеченням рослин вологою. Добре розвинені посіви соняшнику за вегетаційний період споживають від 500 до 600 мм води, а мінімальна потреба у воді задовольняється при 350-400 мм опадів. Потужна коренева система соняшника може засвоювати водні ресурси ґрунту з великої глибини і при великій водоутримуючій силі ґрунту. Завдяки цьому рослина проявляє відносну посухостійкість. При ранній нестачі вологи зменшується площа поверхні

листової пластинки і утворення числа квіток у кошику, в результаті чого зменшується врожайність. При пізньому настанні періоду нестачі вологи листя швидко старіє, чим обумовлюється зниження вмісту олії в насінні [3]. Під час вегетативного розвитку посуха знижує також висоту стебла, діаметр стебла, кількість вузлів та листків [26].

## **1.2. Теоретичні засади селекції соняшника на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища**

Селективна елімінація рекомбінантів (гамет та зигот), відбувається на різних етапах розвитку рослини, а саме на етапах гаметогенезу, проростання пилку та росту пилкових трубок, запліднення, розвитку зародка, формування та проростання насіння. При цьому селективна елімінація гамет та зигот відбувається в тому числі і через загибель під дією факторів зовнішнього середовища. На цей процес суттєву дію мають і генетичні фактори.

Однією з головних цілей як зиготної, так і гаметної селекції, є використання різних засобів, які дозволяють запобігти або послабити елімінуючу дію стабілізуючого добору. Разом з тим, зиготна і гаметна селекція може включати і засоби, що дозволяють цілеспрямовано посилювати тиск стабілізуючого добору (за рахунок жорсткості фону). Іншими словами, мова йде про заміну природної, нерегульованої елімінації гамет та зигот штучно регульованим відбором [27, 28].

Основним шляхом створення сучасних потенційно високоврожайних сортів та гібридів, здатних протистояти різним стресовим факторам, є селекція, яка, зазвичай, ведеться у рослин на стадії вегетації.

Ефективність відбору залежить від правильного вибору фону. Фон забезпечує селекційну перевагу генотипів, специфічно пристосованих до конкретних умов середовища. Селекційний фон повинен бути типовим, тобто умови відбору повинні відповідати середовищним і агротехнічним умовам, в яких надалі буде вирощуватися сорт. Також фон повинен бути здатний виявляти мінливість. Важливим параметром є продуктивність фону, яка оцінюється за середнім значенням всіх генотипів в даних умовах середовища

або відхиленням його від загальної середньої. Фон повинен також максимізувати генетичну варіансу і мінімізувати середовищну. Він також повинен бути доступним для ефективного і дешевого випробування і зберігати всі попередні умови по роках [29].

Ефективна селекційна робота може проводитись із використанням штучних інфекційних та польових провокаційних фонів [30].

Існують модифікації, що дозволяють прискорити селекційний процес. Використання кліматичних камер дозволяє прискорити селекційний процес в 2 рази. З цією метою використовуються також біотехнологічні методи: соматична гібридизація для подолання неможливості схрещування між видами; отримання гаплоїдів та подвоєних гаплоїдів для швидкої гомозиготизації матеріалу та інші [31].

Хоча соняшник і є культурою південних регіонів, однак в умовах півдня України соняшник постійно стикається з підвищеною температурою. Підвищена температура негативно впливає на ріст, розвиток та фізіологічні процеси у соняшника [4]. У силу цього наявність толерантності до зазначеного фактору зовнішнього середовища є невід'ємною умовою реалізації потенційної продуктивності сучасних генотипів соняшнику.

Добір рослин за жаростійкістю може проводитися на стадіях вегетації [32] та на рівні насіння і проростків [33, 34]. Для визначення жаростійкості можна використовувати аналіз наявності та кількості білків теплового шоку у рослин [35]. Оскільки підвищена температура зазвичай супроводжується посушливими умовами, доцільно вести селекцію рослин на стійкість до посухи та до високих температур одночасно.

Просування соняшнику на північ і подальше збільшення посівних площ стримуються недостатньою холодостійкістю, особливо на ранніх етапах. У північних зонах рослини висаджуються в найбільш ранні терміни для того, щоб встигнути дозріти [3, 4]. Ранній посів соняшнику бажаний і в умовах півдня для максимального використання запасів вологи. Слід зазначити, що проведення селекції соняшника на холодостійкість майже не проводиться [4].

Скоростиглі і ранньостиглі сорти та гібриди соняшнику при просуванні на північ часто помітно подовжують вегетаційний період або різко знижують врожайність. Основними причинами цього є чутливість до фотоперіоду і недостатня холодостійкість [5].

Вважають, що для соняшника важливо збільшувати його стійкість до холоду на початкових етапах росту і розвитку, тобто при проростанні насіння, на стадії сходів і 2-3-ої пари листя для того, щоб ранній посів був успішним. На великих висотах і в холодних регіонах необхідно збільшувати морозостійкість при дозріванні для можливості вирощування в даних умовах. Джерелами морозостійкості можуть бути дикі види *Helianthus*, що ростуть в гірській місцевості з суворими зимами та холодної весною [4].

У деяких культур відбір при зниженій температурі за здатністю насіння проростати та депресією розвитку проростків дозволяє виділяти з гібридних популяцій холодостійкі форми [36]. За допомогою пророщування насіння при знижених температурах були виділені деякі холодостійкі сорти соняшнику [37]. Визначення холодостійкості можна проводити також за допомогою визначення біоелектричного потенціалу [38] та кондуктометричного методу [39].

Холодостійкість є полігенною ознакою, і у соняшнику деякі автори вже виділили ряд генів, відповідальних за ранню реакцію рослини на низькі температури [40].

Збільшення посухостійкості рослин – важливий напрямок сучасної селекції. Селекцію на стійкість до посухи не можна розглядати у відриві від технології рослинництва, головним завданням якої повинно бути накопичення і збереження вологи в ґрунті. При цьому важливо в оптимальні терміни отримати повні сходи і захистити рослини від бур'янів, шкідників та збудників хвороб [41]. У соняшника втрати врожаю від посухи можуть досягати 50% [42]

Оцінка посухостійкості може проводитися на різних стадіях розвитку рослини. На стадії дорослої вегетуючої рослини оцінка посухостійкості проводиться як польовими, так і лабораторними методами. Виходячи з того, що існує комплекс ознак, які допомагають рослині переносити посуху і ефективно використовувати воду, при селекції за цими ознаками можна досягти більшої

посухостійкості рослин. Так різними вченими проводилася оцінка посухостійкості рослин соняшнику за рядом морфологічних ознак кореневої системи і високої ефективності використання води [26, 43]. Однак вегетаційний метод досить трудомісткий, громіздкий, має малу пропускну здатність [44].

При діагностиці стійкості до посухи широко використовується оцінка за комплексом параметрів водного режиму. Стійкість рослин може бути оцінена і на основі вимірювання проникності мембран або характеристики енергоперетворюючої діяльності клітини [44, 45]. Перспективним підходом є оцінка рівня абсцизової кислоти (АБК). Цей фітогормон є стресовим і накопичується в рослинах при дефіциті води, виконуючи захисну функцію [46, 47]. Для визначення посухостійкості може бути використано і ряд інших біохімічних параметрів, наприклад вміст аквапоринів, дегідринів, фруктозо-1,6-біфосфатази [48]. Вміст вільного проліну та активність пероксидази також можуть бути використані для виявлення фактора індукції дефіциту води [49]. Оцінку посухостійкості можна проводити і за біоелектричною реакцією рослин на осмотичний стрес та зневоднення [38]. Можна використовувати і ексікаторний метод, заснований на оцінці здатності клітин виживати при їх зневодненні [33]. Культивування експлантів, які були отримані з зародків насіння, на штучному середовищі з різним осмотичним стресом до появи органів досліджуваної рослини також може бути використано для оцінки вихідного матеріалу та проведення штучного добору [50].

Ефективною є оцінка посухостійкості і на стадії проростків за здатністю їх зростання під дією зневоднення [51]. Для визначення посухостійкості використовують і ступінь гідролізу статолітного крохмалю в кореновому чехлику зародкових корінців [33].

На стадії насіння використовують метод визначення посухостійкості за здатністю проростання насіння при нестачі води, моделюючи умови посухи розчином сахарози [52].

### 1.3. Теоретичні засади гаметофітної селекції

Відомо, що у покритонасінних рослин, незважаючи на сильну редукованість гаплоїдного покоління, зберігається можливість чоловічого гаметофітного добору [27, 53, 54, 55].

У природних умовах пилкова селекція обумовлює адаптацію потомства до екониші вирощування [56]. Наприклад, у мигдаля при зміні умов вирощування генотипів змінювався процент проростання пилку, що підтверджує наявність добору [57]. У гороху овочевого при зміні умов освітлення, змінювались середні розміри пилкових зерен, популяція яких розпадалась на три біотиби, якщо горох висівався у теплиці в ранньовесняний період [58]. У деяких культур відмічається поява аномалій чоловічих та жіночих гаметофітів під впливом підвищених температур у польових умовах [59].

В результаті проведення експериментів різними групами дослідників було встановлено, що від 60% до 80% структурних генів, які експресуються в пилку, експресуються також і в спорофіті [22]. Наприклад, було показано, що при порівнянні білків дорослої рослини томата і ферментів пилку приблизно 60% їх виявлено як в гаметофіті, так і в спорофіті. І навпаки, 18 з 19 ферментів пилку знайшли у дорослих рослин [60]. У кукурудзи приблизно 72% генів [61], у тополі 74-80% генів [62], а у традесканції 64% генів [63], які експресуються у пилку, експресуються також у спорофіті. Це свідчить про те, що транскрипція з генів йде в гаплоїдному геномі і відповідно здійснюється відбір на ознаки, що контролюються генами, які експресуються на стадії як гаметофіту, так і спорофіту. Крім того, пилок слугує вектором генетичної інформації, що визначає конкурентоспроможність пилкових зерен при проростанні і рості пилкових трубок і елімінацію рекомбінантних гамет на критичних фазах онтогенезу [54, 64, 65].

На підставі гіпотези про вираженість частини спорофітного геному в гаплоїдній фазі було висловлено припущення про те, що відбір мікрогаметофітів, стійких до якого-небудь екстремального фактору середовища, може забезпечити появу спорофітів з подібною стійкістю [64,

65]. Це припущення підтвердилося експериментальними дослідженнями, виконаними, в основному, на томаті, а згодом на бавовнику, рисі та інших культурах. Підтвердження цього припущення було отримано в тому числі з використанням методів трансгенної реконструкції [66]. В останні роки була показана висока ефективність пилкової селекції не тільки на стійкість до абіотичних факторів середовища, таких як підвищена температура [13, 17, 67, 68], понижена температура [7-13, 16, 17, 20, 68], посухостійкість [18, 68], солестійкість [69], стійкість до важких металів [70], стійкість до гербіцидів [71], стійкість до токсичних речовин [72], але і біотичних факторів середовища [73, 74]. Проте існують дані, що стійкість до абіотичних факторів не завжди однаково проявляється як в гаметофіті, так і в спорофіті. Навіть в межах одного виду можуть існувати генотипи, які проявляють стійкість як на гаметофітному рівні, так і на спорофітному, та генотипи, які проявляють стійкість лише в одній з фаз розвитку [10, 75].

Успіх проведення мікрогаметофітного добору залежить від двох умов: наявності генетично різноякісного пилку і експресії одних і тих же генів у гаплоїдному і диплоїдному поколіннях. Ефективність добору також залежить від часу експресії у мікрогаметофітній стадії генів, що детермінують ознаки, за якими ведеться селекція спорофіту [22, 28, 64, 76, 77, 78]. Зазвичай у рослин, що мають пилкок, який складається з трьох клітин, значна частина генів гаметофіту експресується як на стадії формування пилку, так і на стадії функціонування зрілого пилку. В той же час, у рослин, що мають пилкок, який складається з двох клітин, частіше велика кількість генів проявляють свою активність під час формування пилку [79].

Використання різних стимуляторів дозволяє зменшити показник стерильності пилку в тому числі і при віддаленій гібридизації, що забезпечує розширення спектру генотипічної мінливості ознак у потомстві, що розщеплюється [28, 80].

Відомо також, що за швидкістю проростання пилку і росту пилкової трубки є значна генетична мінливість. При цьому вважають, що ріст пилкової трубки знаходиться під контролем полігенних систем. Генетична

гетерогенність пилку у гібридів обумовлює різну конкурентну здатність мікрогамет, в тому числі швидкість росту пилкових трубок, що і визначає генотипову та модифікаційну різноякісність зигот та насіння. Оскільки число пилкових зерен, що потрапляють на приймочку маточки, зазвичай в багато разів перевищує число яйцеклітин, швидкість росту пилкової трубки виступає в якості одного з основних факторів, що визначають імовірність успіху при її конкуренції з іншими трубками. При цьому 10-15% пилкових зерен не проростають на приймочці, а з тих, що проросли, лише 15-20% досягають основи маточки. Вищесказане припускає, що селекція мікрогаметофітів на даному етапі їх функціонування може бути ефективним прийомом зміни певних ознак спорофіта [28, 60, 81, 82, 83, 84, 85]. Відмічається, що особливу роль добір за конкурентною здатністю пилку грає у регулюванні генетичної мінливості кількісних ознак, які контролюються комплексом комбінацій генів [86]. Слід також приймати до уваги той факт, що у деяких рослин спостерігається диференціальна абортивність плодів з різним числом насіння, що підвищує конкуренцію під час гаметофітного добору [87].

Слід також зазначити, що ефективність добору залежить не тільки від умов запліднення, але і від фізіологічного стану популяції пилку та рослини-запильника [76].

Встановлено, що мікрогаметофітний добір за конкурентоспроможністю пилку, основним компонентом якого вважається ріст пилкової трубки, змінює якість спорофітного покоління як в штучних, так і в природних популяціях рослин, забезпечуючи перевагу найбільш пристосованим генотипам. Обмежене запилення забезпечує можливість участі в процесі запліднення зазвичай неконкурентоспроможних гамет та призводить до суттєвого збільшення діапазону генотипової мінливості за кількісними ознаками та грає велику роль в попередженні елімінації гамет, що додатково збільшує генетичну різноякісність пилку. Для розширення спектру генетичної мінливості використовують також обмежене запилення (30-50 пилкових зерен) сумісно зі стимуляцією росту та проростання пилку (нанесення розчинів вітамінів В1, В6; водні екстракти приймочок квіток; гібберелову кислоту; стероїдні глікозиди; термічно вбитий

пилку одного з батьків). Це забезпечує більший процент проростання пилку та його участь у заплідненні ніж при простому обмеженому запиленні. Експериментальні дані показали, що з використанням цієї методики відмічається зсув за маркерами та кількісними ознаками відносно контролю у популяції  $F_2$ , що розщеплюються [28, 64, 81, 82].

Внутрішній гаметофітний добір відбувається вже в періоди утворення пилку, а зовнішній – при переносі пилкових зерен, їх проростанні та рості пилкових трубок. Конкурентна ієрархія між насінневими зачатками залежить від послідовності запліднення, або формування в межах плоду напівавтономних інтегрованих фізіологічних одиниць. Зниження елімінації генотипів на етапах формування жіночих гамет з використанням біологічно активних речовин типу стероїдних глікозидів шляхом трикратного змочування зав'язі протягом періоду від початку формування жіночого гаметофіта до зрілого зародкового мішка або протягом трьох діб після кастрації до запилення дозволяє змінити середні значення та норму реакції деяких ознак, змінити розщеплення за маркерними ознаками у порівнянні з контролем [28, 80].

Ефективність пилкового добору за різними напрямками і для різних культур буде визначатися експресією генів у гаплоїдному і диплоїдному поколіннях, і саме встановлення наявності кореляцій між ознаками спорофіта і гаметофіта є першим і неодмінним етапом розвитку даного методу селекції.

На наявність зв'язку між швидкістю росту пилкових трубок гібридних рослин  $F_1$  і формуванням певних ознак в потомстві гібридів томатів вказували Алпатьев и Юрьева [88]. Інтенсивна конкуренція пилкових трубок у *Cucurbita pepo* [89] сприяла утворенню потомства з більш раннім розвитком. Виявлено вплив інтенсивності пилкової конкуренції на спорофітне покоління у *Fagopyrum esculentum* [90]. Також виявлений зв'язок між конкурентною здатністю пилку і такими ознаками спорофіту, як маса зерен, суха маса сіянців і ріст коренів проростків *in vitro* у кукурудзи [91], маса сіянців у *Dianthus sinensis* [81] та ін. У моркви стабільна середня кореляція встановлена між довжиною пилкових зерен та показниками розвитку репродуктивних органів і пізньостиглістю насінника. Проте для добору на рівні пилку за цим показником

необхідна висока інтенсивність добору. Лінії закріплювачі стерильності у моркви продукували пилок зміненої форми. У сортових популяціях, орієнтуючись на характеристики пилку окремих рослин, можна виділяти певні біотиби для подальшої селекційної роботи з ними [92].

Перевагою пилкового добору є мікроскопічний розмір та гаплоїдний стан генотипу, що забезпечує експресію рецесивних генів, багато з яких як раз і обумовлюють господарську цінність культурних рослин [22, 23, 28]. До числа безсумнівних переваг пилкової селекції слід віднести не тільки залучення до штучного відбору величезної кількості генотипів, але і можливість регулювати «жорсткість» добору в умовах, які суворо контролюються [22, 23, 28, 64].

Мікрогаметофітний добір може проводитись у вигляді оцінки пилку на стійкість до несприятливих абіотичних та біотичних факторів середовища, а також для скринінгу біохімічних показників, та в подальшому відборі спорофітів з найкращими показниками стійкості пилку [15, 16, 92, 93, 94, 95].

До гаметної селекції можна віднести андрогенез у штучній культурі – отримання рослин з мікроспор пиляків та ізольованого пилку. Цей метод з успіхом використовувався у плодових та ягідних порід, а саме у вишні, черешні, черемхи, їх міжвидових гібридів та у яблуні. Вже отримані рослини з різним рівнем плоїдності [96] та солестійкі форми рослин [97].

Існують дані, що у деяких рослин можливе виникнення гамет, які мають збільшену плоїдність. Це є причиною стерильності даного пилку у нормальних схрещуваннях. Проте останнє є непрямим доказом процесу поліплоїдії, що вказує на формування нових генотипів, які можуть бути використані в селекційній практиці [98, 99].

Сьогодні активно розвиваються дослідження з гаметної селекції. Використання методу пилкового добору може значно підвищити результативність селекційного процесу в цілому. Пилкова (гаметна) селекція в даний час відкриває нові перспективи отримання стійких форм. На відміну від методу культури *in vitro*, що використовується останнім часом, вона має важливу перевагу: зберігає цілісність і індивідуальність генотипу, не вимагає

складної системи регенерації рослин, при цьому відбір переноситься на гаплоїдну стадію і нестійкі пилкові зерна елімінують [31].

Зараз вже сформовано ряд напрямів добору за пилком:

- екотипова селекція за мікрогаметофітом на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища та фітопатогенів;
- використання популяцій пилкових зерен як тест-системи для дослідження адаптивності до екониші вирощування;
- обробка пилкових зерен перед запиленням фрагментами ДНК з метою розширення фонду добору при міжвидовій гібридизації;
- корекція мейозу за допомогою впливу на пилки БАР (біологічно активних речовин) для збереження цінних рекомбінантних гамет на постмейотичних етапах комбінаційної селекції [100].

Вже зараз спектр культур, на яких показана можливість відбору цінних генотипів на мікрогаметофітному рівні, досить широкий і включає в себе такі важливі для людини види, як томат, огірки, кукурудза, капуста, бавовник, рапс, льон та ін. Досить великим є і перелік факторів середовища (як абіотичних, так і біотичних), за якими можна успішно вести мікрогаметофітну (пилкову) селекцію. До них слід віднести знижену і підвищену температуру, хлоридне та сульфатне засолення, важкі метали, гербіциди, різні хвороби.

Вже існують сорти рослин, отримані з використанням мікрогаметофітного добору, наприклад сорт ріпи японської «Снегурочка» [100] та сорт льону олійного «Південна ніч» [101].

Існують дані про ведення селекційного процесу з одночасним використанням спорофітного та гаметофітного добору. Використовуючи цю методологію отримано холодостійкий сорт солодкого перцю «Пам'яті Жигалова» [15]. Використання комбінованого добору (за гаметофітом у  $F_1$  та за проростками у  $F_2$ ) більш ефективно у порівнянні з добором лише за гаметофітом [9]. Слід зазначити, що частота генів у популяції може впливати на ефективність спорофітного та гаметофітного добору. При частоті генів у популяції 0,5 та вище добір на стадії спорофіту є більш ефективним, ніж добір на стадії гаметофіту. Проте, якщо частота генів у популяції менше 0,5, тоді

гаметофітний добір є більш ефективним, ніж спорофітний. Однак одночасне проведення добору як на рівні спорофіту так і на рівні гаметофіту є більш ефективним та може значно прискорити селекційну роботу [102].

#### **1.4. Практичні результати добору цінних генотипів на рівні пилку**

*Гаметофітний добір на холодостійкість.* Добір холодостійких генотипів можна проводити як на стадії зрілого пилкового зерна, так і в період проростання пилку та росту пилкових трубок. При роботі з гібридами першого покоління, вихідний матеріал, за допомогою якого вони були отримані, повинен бути контрастний за холодостійкістю на рівні як спорофіту, так і гаметофіту. Хоча для визначення контрастності за холодостійкістю вихідного матеріалу при одержанні гібридів можливо оцінювати лише спорофіт або гаметофіт, враховуючи їх однотипну реакцію.

Так, наприклад, різні генотипи ріпаку ярого однотипно реагують на холод як на спорофітному, так і на гаметофітному рівні [103]. У льону олійного між стійкістю гаметофіту та спорофіту до даного температурного фактору існує високий позитивний зв'язок ( $r=0,8$ ) [104]. Однак, у перцю солодкого не у всіх випадках було виявлено тісний зв'язок між холодостійкістю спорофіту та гаметофіту [75]. Така ж картина спостерігалася і в дослідях з томатами [10].

Перед проведенням безпосередньо гаметофітного добору, зазвичай, встановлюють життєздатність пилку при дії на нього екстремального фактору зниженої температури для визначення його сили. У льону олійного життєздатність пилку залишається досить високою навіть після 10 діб зберігання при температурі 3-7°C, тоді як при температурі 18-25°C вже навіть після 3 діб зберігання спостерігається суттєве зниження його життєздатності [104]. При оцінці перцю солодкого на холодостійкість за гаметофітом пророщування пилку проводять при 12°C [75].

Показано, що витримування пилку гібрида  $F_1$  ріпаку ярого при понижених температурах, а саме при 3°C та 10°C протягом 7 та 10 діб суттєво підвищує холодостійкість спорофітних популяцій  $F_2$ , причому температура 3°C діє більш ефективно [7, 8]. Запилення біотипів сортопопуляції ріпи японської

проводилося пилком, який було витримано при температурі  $-3^{\circ}\text{C}$  протягом трьох діб. У чотирьох з семи біотипів дослідної сортопопуляції спостерігалось збільшення рівня холодостійкості спорофітного покоління [16].

Вплив зниженої температури ( $9^{\circ}\text{C}$ ) протягом двох діб на мікрогаметофіт в період проростання пилку і росту пилкової трубки гібридів  $F_1$  ріпаку ярого, отриманих від схрещування контрастних за холодостійкістю зразків, забезпечував підвищення холодостійкості спорофітних популяцій наступних другого та третього поколінь рослин [7, 8].

Добір у  $F_1$  пилку, стійкого до дії зниженої температури, сприяє підвищенню холодостійкості одержаного спорофітного покоління  $BC_1$  у льону олійного та зміні структури популяцій  $BC_1$  за такими ознаками як кількість бічних пагонів, забарвлення віночка, тривалість періоду «сходи-цвітіння» [68, 101, 105].

Для проведення гаметофітного добору на холодостійкість у нуту гібриди  $F_1$  після запилення переносять у приміщення з температурним режимом  $12/7^{\circ}\text{C}$  (ніч/день) на три добу. Отримане у таких рослин насіння оцінюють на холодостійкість, пророщуючи його на фітотроні при температурному режимі  $18/8^{\circ}\text{C}$  (ніч/день). Проведення такого добору підвищує холодостійкість популяції рослин  $F_2$  та змінює структуру популяції за ознакою забарвлення квіток [20].

У *Phalaenopsis* гаметофітний добір на холодостійкість проводився наступним чином. Гібриди  $F_1$  після запилення вирощували при температурному режимі  $15/10^{\circ}\text{C}$  (ніч/день) протягом семи діб. Отримане покоління  $F_2$  вирощували при температурі  $10^{\circ}\text{C}$ . Було відзначено, що сіянці, отримані після проведення гаметофітного добору були більш розвинені, ніж у контролі [17].

У томатів для підвищення холодостійкості наступного покоління рослини  $F_1$  та сортів після запилення ставлять у камеру штучного клімату з температурним режимом  $8/12^{\circ}\text{C}$  (ніч/день) на чотири доби. Потім рослини повертають на нормальний температурний фон. Приймочки запилених квіток видаляють для запобігання можливого проростання пилку при оптимальній температурі [80].

Для проведення добору на холодостійкість з використанням жіночого гаметофіту у томатів каструють квітки на стадії жовто-зеленого забарвлення бутону. Після чого рослини ставлять у камери штучного клімату з температурним режимом 6/12°C ніч/день на 120 годин. Потім рослини повертають в оптимальні умови та через 5 годин запилюють, використовуючи для запилення пилок, що зібрано з рослин, які росли в нормальних умовах [80].

У томатів також було проведено сумісний гаметофітний добір на холодостійкість як у фазі формування пилку, так і на стадії росту пилкової трубки. Гібриди  $F_1$  вирощували при понижених температурах, потім пилок цих гібридів використовували для отримання популяції  $BC_1$ . Проростання пилкової трубки після запилення батьківської форми пилком гібриду, проходило при пониженій температурі. Такий вплив дозволив збільшити процент проростання пилку рослин популяції  $BC_1$  при пониженій температурі, що свідчить про збільшення холодостійкості рослин на гаметофітному рівні [11].

Ефективність мікрогаметофітного добору на холодостійкість раніше була продемонстрована і на кукурудзі. Рослин  $F_1$  за годину до запилення переносили у приміщення з температурою 10-13°C та 16-18°C. Через шість діб після запилення рослини поміщали у нормальні умови. Такий вплив на пилок під час проростання та росту пилкової трубки змінювало генетичну структуру популяції за деякими маркерними ознаками та збільшувало холодостійкість популяції  $F_2$  [13]. Слід зазначити, що довготривале витримування пилку навіть при нормальній температурі у кукурудзи може викликати зміни генетичної структури популяції [106].

Витримування пилку гібрида  $F_1$  соняшника протягом 7 та 10 діб при низьких позитивних температурах (3°C та 10°C) на відміну від збереження при кімнатній температурі суттєво впливає на структуру популяції  $F_2$ , що розщеплюється. Так, суттєво збільшилась частота рослин з більшими висотою та періодом «сходи-цвітіння» [107]. Однак, вплив такого добору на стійкість популяцій спорофітів до понижених температур не досліджувався.

У огірків проведено ряд дослідів, які показують можливість проведення добору на холодостійкість як на рівні гаметофіту, шляхом пророщування пилку

при пониженій температурі, так і на рівні спорофіту (пророщування проростків при пониженій температурі) [108]. Використовуючи пилковий добір створені лінії холодостійких огірків [100].

У моркви серед насінників проводили добір за здатністю пилку окремих рослин проростати при пониженій температурі ( $t$  15°C) та за вирівняністю сортової популяції за морфологічними параметрами пилкових зерен. Насіння з рослин, відібраних за здатністю пилку проростати при пониженій температурі та за вирівняністю пилку, мали як більш високу схожість, так і підвищену енергію проростання при пониженій температурі у порівнянні з вихідною популяцією. Динаміка схожості насіння була краща і при нормальній температурі, що вказує на більш високу загальну адаптивність виділених рослин [92].

Пилковий добір може також використовуватись на рівні вихідного матеріалу для отримання стійких гібридів першого покоління, враховуючи, що часто цей вихідний матеріал є гетерогенним по відношенню до фактору добору. Так, в результаті проведення пилкового добору на холодостійкість у вихідних ліній томату, шляхом витримування пилку протягом 3-10 діб при 5°C, гібриди  $F_1$ , отримані від запилення цим пилком, характеризувалися більшою холодостійкістю, ніж у разі використання не обробленого низькою температурою пилку [10].

*Гаметофітний добір на жаростійкість.* Добір стійких до високих температур генотипів можна проводити на стадії зрілого пилкового зерна та у період проростання пилку та росту пилкових трубок. Матеріал, який досліджується має бути гетерогенним за ознакою жаростійкості.

Використовуючи для запилення прогрітий у термостаті при  $57 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 3-4 годин пилок томату можна підвищити жаростійкість сортових популяцій та популяцій, що розщеплюються, на 3-10% [80].

Для впливу високих температур на пилок у період проростання пилку та росту пилкової трубки рослини гібридів  $F_1$ ,  $F_2$  та сортів томату після запилення ставлять у камеру штучного клімату з температурним режимом 25/37°C

(ніч/день) на 48 годин. Потім рослини повертають у нормальні температурні умови (25°C), попередньо видаливши приймочки у запилених квіток [80].

У томатів також проводили гаметофітний добір з використанням жіночих гамет. Для цього каструють квітки на стадії жовто-зеленого забарвлення бутону, після чого рослини ставлять у камери штучного клімату з температурним режимом 18/35°C ніч/день на 72 години. Потім рослини повертають в оптимальні умови та через 5 годин запилюють, використовуючи для запилення пилок, що зібрано з рослин, які росли в нормальних умовах. Використана методика дозволяє отримати стійкі до температурного фактору нові форми та лінії [80].

Добір пилку з використанням підвищеної температури може використовуватися для зміни структури популяцій рослин, що розщеплюються. У деяких видів томату використання для запилення прогрітого пилку (58°C/3 год.) збільшувало вміст насіння у плодах в 1,2-1,6 рази. В той же час у деяких видів цей показник не змінювався, а у деяких навіть знижувався в 1,7 рази. Також термообробка пилку викликала зменшення періоду від сходів до дозрівання плодів на 1-7 діб в залежності від виду та різновиду томату, але не викликала змін за цим показником у деяких гібридів F<sub>1</sub>. Термообробка пилку у першому поколінні збільшила життєздатність пилку на 2,3-51,0% у 5 зразків з 7 у наступному поколінні. Також запилення прогрітим пилом у першому поколінні викликало збільшення кількості плодів, що зав'язалися, на 12,1-110,5% у наступному поколінні. При цьому спостерігали 1,5-2-кратне зниження варіабельності ознаки «кількість суцвіть на рослині» [109].

Успішний гаметофітний добір на жаростійкість також було проведено у *Phalaenopsis*. Гібриди F<sub>1</sub> цієї рослини після запилення вирощували при температурному режимі 30/25°C (ніч/день) протягом трьох діб, а отримане таким чином друге покоління вирощували при температурі 30°C. Сіянци F<sub>2</sub>, які були отримані з використанням гаметофітного добору, були більш розвинені, ніж у контролі, при пророщуванні з підвищеними температурами [17].

Зміну генетичної структури популяції, що розщеплюється, після прогрівання пилку гібридів томату спостерігати і на рівні біохімічних показників, а саме при електрофоретичному розділі білків [110].

У кукурудзи прогрівання пилку гібридів  $F_1$  при температурі  $35^\circ\text{C}$  протягом 5-20 хвилин змінило генетичну структуру популяції за деякими маркерними ознаками [13].

Прогрівання гетерогенних за чутливістю до підвищеної температури популяцій пилкових зерен гібридів  $F_1$  соняшника при температурі  $60^\circ\text{C}$  протягом 3-х годин чинить значний селективний тиск, викликаючи при цьому зміни структури популяцій, що розщеплюються. В результаті такої обробки в популяціях спорофітів, що розщеплюються, істотно змінюється частота генотипів за деякими кількісними ознаками, таким як висота рослини, тривалість періоду «сходи-цвітіння», кількість бічних пагонів і ін. [111]. В той же час, ці дослідження не вказують на здатність такого добору змінювати стійкість популяцій до високих температур.

*Гаметофітний добір на посухостійкість.* Добір посухостійких генотипів зазвичай проводять на стадії зрілого пилкового зерна, проте існує можливість проведення добору і у період проростання пилку та росту пилкової трубки.

Разом з тим, відомі дані про існування високого позитивного зв'язку ( $r=0,9$ ) між стійкістю гаметофіту до високої температури та здатністю насіння проростати в умовах підвищеного осмотичного тиску у льону олійного [112]. Також виявлена позитивна залежність між стійкістю до підвищеної температури мікрогаметофітів і посухостійкістю спорофіта у рицини, що забезпечує можливість відбору посухостійких генотипів на мікрогаметофітному рівні. Встановлена позитивна кореляція між здатністю пилку різних зразків рицини проростати на живильних середовищах з підвищеним вмістом сахарози та здатністю рослин рости і давати врожай при нестачі ґрунтової вологи [113].

У сорго проведення гаметофітного добору на посухостійкість проводилось з використанням осмотично активної речовини ПЕГ 6000. Квітки гібридних рослини за годину до запилення змочували 36%-вим розчином ПЕГ 6000, який слугував селективним бар'єром для пилку. Популяції рослин  $F_2$ ,

отримані з використанням гаметофітного добору, виявились більш посухостійкими, ніж контрольні популяції [18].

Добір у  $F_1$  льону олійного пилку, стійкого до підвищеної температури, забезпечував краще проростання насіння та ріст корінців у розчині осмотику, що вказує на суттєве підвищення посухостійкості отриманого спорофітного покоління. Ефективність добору була максимальною тоді, коли пилки прогрівалися при температурі  $35^{\circ}\text{C}$  протягом 120 хвилин [14]. У результаті добору стійких до підвищеної температури мікрогаметофітів у гібридів  $F_1$  льону олійного, одержаних від схрещування контрастних за посухостійкістю генотипів, у структурі популяцій  $BC_1$ , що розщеплюються, були виявлені зміни в співвідношенні рослин за різними ознаками, які виступають в якості маркерних (кількість бічних пагонів і кут їх відхилення, тривалість періоду «сходи-цвітіння») [14].

У рицини селекція стійкого до підвищеної температури пилку в більшості гібридних комбінацій викликає значні зрушення в структурі популяції нащадків гібридів за рядом ознак вегетативної та генеративної сфери рослини. Прогрівання гетерогенної популяції пилкових зерен гібридів викликає істотне збільшення серед їх нащадків частки особин з маркерною ознакою, характерною для стійких до посухи генотипів, що побічно свідчить про підвищення посухостійкості популяції спорофітів, що розщеплюється [68, 113].

*Гаметофітний добір на солестійкість.* Добір гамет на солестійкість може проводитись як на стадії зрілого пилку так і під час формування пилку та насінневих зачатків.

Гаметофітного добору на солестійкість у ячменя проводився шляхом схрещування гібридних рослин, які росли в умовах засолення, що призводило до формування солестійких гамет. Такий добір виявився ефективним та дозволив підвищити солестійкість популяцій, які були отримані після проведення такого дослідження [114].

У оливи було виявлено кореляційний зв'язок між солестійкістю пилку та спорофіту, що може бути використано для проведення гаметофітного добору та пришвидшення селекційної роботи з цією рослиною [115].

*Гаметофітний добір за конкурентною здатністю пилку.*

Використовуючи методику пилкового добору можна ефективно вести селекцію за такими ознаками як тривалість періоду «сходи-цвітіння» та скоростиглість. Це можливо завдяки існуванню достатньо високого ступеня зв'язку між мікрогаметофітною ознакою «швидкість проростання пилку та росту пилкових трубок» та спорофітними ознаками «тривалість періоду «сходи-цвітіння»» та «скоростиглість».

У льону олійного швидкість проростання пилку та росту пилкових трубок позитивно корелює з тривалістю періоду «сходи-цвітіння». Враховуючи це, добір проводили, змінюючи інтенсивність добору серед найбільш конкурентоздатних мікрогаметофітів у гібридів  $F_1$ , одержаних від схрещування контрастних за швидкістю проростання та росту пилкових трубок генотипів. Різну інтенсивність добору за швидкістю росту пилкової трубки забезпечували, змінюючи тривалість періоду (від 40 хв. до 2 год.) між запиленням та видаленням частини маточки. Частота генотипів з коротким періодом «сходи-цвітіння» була найбільшою у варіанті з мінімальним інтервалом часу до видалення половини маточки. Отже добір у  $F_1$  мікрогаметофітів, які відрізняються високою швидкістю проростання та росту пилкових трубок, забезпечував істотне збільшення в популяціях  $F_2$  кількості генотипів з раннім цвітінням [116].

Разом з цим, у структурі популяцій  $F_2$  льону олійного, що розщеплюються, виявлені зміни за деякими маркерними ознаками. А саме у дослідних популяціях збільшується частота рослин, що мають синє забарвлення квіток, яке характерно для батьківського компонента, що має більшу швидкість проростання та росту пилкових трубок. Відповідно частота появи рослин з білим забарвленням квіток, що характерні для генотипів з меншою швидкістю проростання та росту пилкових трубок, зменшується [116].

У ріпаку ярого вивчався вплив добору за конкурентоспроможністю пилку у гібридів  $F_1$  на якість спорофітного покоління  $F_2$ . Мікрогаметофіти, що несуть гени, які детермінують раннє цвітіння, є менш конкурентоспроможними в оптимальних для ярих форм ріпаку температурних умовах та, як наслідок, між

швидкістю росту пилкової трубки та скоростиглістю є негативний зв'язок. Це означає, що для реалізації серед нащадків більшої кількості ранозацвітаючих рослин необхідно в процесі запилення-запліднення виключати конкуренцію між пилковими зернами. Це досягається тим, що під ізолятором на приймочку кастрованого за добу до розпускання квітки кінчиком препарувальної голки або іншим інструментом, що підходить, наноситься обмежена (5-50) кількість пилкових зерен. В результаті такого «обмеженого» запилення виключається конкуренція між мікрогаметофітами і серед нащадків реалізуються практично всі генотипи гамет. Відбувається збільшення частоти скоростиглих генотипів в потомстві гібридів за рахунок зниження конкуренції між мікрогаметофітами [117].

У рицини інтенсивність мікрогаметофітної конкуренції в період проростання пилку та росту пилкових трубок у гібридів  $F_1$  впливає на якість спорофітного покоління  $F_2$  за ознакою «скоростиглість». Різну інтенсивність добору за конкурентоспроможністю пилку забезпечували за рахунок нанесення пилкових зерен на проксимальну (низька інтенсивність конкуренції) та дистальну (висока інтенсивність) по відношенню до зав'язі частини приймочки. Різниця у відстані між проксимальним (ближнім до зав'язі) і дистальним (дальнім) розміщенням пилку становить від 8 до 15 мм в залежності від генотипу. Для запилення в обох випадках використовували надлишкову кількість свіжозібраного пилку, що збільшувало конкуренцію між пилковими зернами [118].

В залежності від інтенсивності конкуренції мікрогаметофітів при самозапиленні гібридів рицини структура популяцій  $F_2$  суттєво змінюється за рядом морфологічних ознак, а саме наявність шипів на коробочці та антоціану в рослині, форма коробочки та пухкість китиці. Найбільш інтенсивна конкуренція пилку в  $F_1$  забезпечує збільшення в  $F_2$  кількості генотипів з кращим раннім розвитком. Таким чином, існує позитивний зв'язок між конкурентоспроможністю пилку та скоростиглістю рицини [118].

У кукурудзи за допомогою гаметофітного добору за конкурентною здатністю пилку отримано лінії, що мають підвищену конкурентну здатність

пилку. Використання такого добору змінювало структуру популяцій, що розщеплюються, за кількісними ознаками [119].

Використовуючи лінії з найбільш високими показниками за ознаками вирівняності та конкурентоздатності пилку у моркви отримують гібриди, які мають вищу продуктивність та вирівняність коренеплодів [92].

*Гаметофітний добір на стійкість до хвороб.* Важливим напрямком гаметної селекції є підвищення стійкості рослин до хвороб. Це забезпечується тісним зв'язком між чутливістю гамет до токсинів хвороб та чутливістю до хвороб спорофітів. Заражені рослини впливають на параметри пилку, а це, у свою чергу – на стійкість рослин до патогенів. Процент проростання пилку *in vitro*, а також показники росту пилку *in vivo* в тканинах маточки під дією метаболітів збудників можуть слугувати і для штучного добору, а також є показниками оцінки стійкості рослин до збудників хвороб. В якості селективних агентів використовують як метаболіти, так і токсини патогенів [74]. Присутність токсинів збудників хвороб може забезпечити елімінацію чутливих гамет, а отже забезпечити проведення добору.

Так, існують дані про ефективний добір на рівні пилку на стійкість до токсину *Fusarium oxysporum* у рицини. Для проведення добору у гібридів F<sub>1</sub>, отриманих від контрастних за стійкістю до фузаріозу рослин, на приймочки квіток наносили 100%-вий культуральний фільтрат на основі середовища Чапека. Потім рослини запилювали власним пилком і ізолювали. Оцінку популяцій F<sub>2</sub> проводили на інфекційному фоні в польових умовах [120].

Результати показали зменшення кількості уражених рослин у дослідних популяціях в порівнянні з контрольними. У популяції F<sub>2</sub> також відмічали вплив добору на ряд кількісних ознак вегетативної та генеративної сфер, що свідчить про зчеплення генів стійкості до хвороби з генами, що визначають ці кількісні ознаки у рицини [120].

Розроблено метод добору стійких мікро- та макроспор люцерни до культурального фільтрату збудника фузаріозу. Було використано одночасний селективний вплив на мікро- та макроспорогенез. Для добору на стійкість до фітопатогенних грибів були використані культуральні фільтрати (КФ) двох

високовірулентних ізолятів збудників фузаріозу люцерни (*Fusarium culmorum*, *F. Sambucinum*), якими обробляли генеративну сферу рослини. Також використовувався препарат фузарієвої кислоти – токсичний фактор грибів роду *Fusarium*. При збільшенні концентрації КФ зменшується як процент проростання пилку, так і довжина пилкових трубок. Суттєвий вплив проявила обробка генеративної сфери люцерни КФ у розведенні 1:1 (на 10%-вій сахарозі), який виявився у зменшенні кількості бобів, що зав'язалися (25%), а особливо у зменшенні кількості бобів на одне суцвіття (3,5 шт.). Насіння, що було отримано в результаті впливу селективного фактору на генеративну сферу, мало більш високий процент проростання (20,77 %) на КФ, ніж у контролі (2,9 %). Таким чином, КФ у розведенні 1:1 може бути використано в якості селективного фактору [121].

Показана можливість проведення добору у огірків до корневих гнилей як на рівні гаметофіту, шляхом нанесення розчину токсину на приймочку квіток, так і на рівні спорофіту [108].

Використовуючи стійкість пилку томату до фузарієвої кислоти (0,3 г/л), а саме процент проростання пилку та довжину пилкових трубок, які мали помірний ( $r=-0,52$ ) та тісний ( $r=-0,77$ ) кореляційний зв'язок з балом ураження рослин фузаріозом відповідно, можна проводити добір стійких форм рослин на різних етапах селекційного процесу [122]. За допомогою схожої методики гаметофітного добору у томатів можливо проводити добір рослин на стійкість до кладоспоріозу [123].

У пшениці винайдено ефективний спосіб скринінгу вихідного матеріалу до *Fusarium graminearum* Schwabe з використанням культури ізольованого колосся на середовищі з додаванням культурального фільтрату патогену. Виявлено також, що у гетерогенних гібридних популяціях, при наявності генетично обумовленої ознаки стійкості, проведення гаметофітного добору шляхом інкубації і промивання пилку у середовищі, що містить токсичні метаболіти патогену, дає можливість добору резистентних форм у популяціях, що розщеплюються. Також спостерігається зміна генетичної структури популяції за ознакою остистість [124].

Також проводився добір на рівні мікрогаметофіту на стійкість томату до *Alternaria solani*. Для цього створювався селективний бар'єр на приймочці квітки, який представляв собою мікроінфекційний фон. Краплю розчину токсину альтернарії (0,001%, 0,01% та 0,1%) наносили на приймочки кастрованих квіток, що не розкрились, і одразу проводили запилення надлишком пилку, який було зібрано з цієї ж рослини. Результати добору оцінювали за параметрами зав'язуваності плодів та кількістю насінин у плодах. За результатами дослідів виявлено достовірну різницю за цими показниками порівняно з контролем. Даний метод гаметної селекції забезпечував результати не гірше, а в окремих варіантах значно перевищував традиційний метод добору стійких до хвороби рослин, а саме багаторічне вивчення на штучному інфекційному фоні [125, 126].

Зараження рослин томату грибом *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler збільшує амплітуду мінливості ознаки «площа пилкового зерна». Також змінюється морфологія, кількість ДНК та дисперсія хроматину, тобто змінюється функціональна активність геному. Ці зміни різняться у генеративних та вегетативних клітин однієї рослини, також вони залежать від генотипу рослини [74].

Можливість відбору вихідного матеріалу за стійкістю до *Alternaria helianthi* на рівні гаметофіту шляхом пророщування пилку на культуральному фільтраті патогену показана у соняшника [127]. Пізніше у соняшника було проведено 1-2 цикли спорофітного та гаметофітного добору на стійкість до *Alternaria helianthi* Hanf. у гібридів, що мали гетерогенні за показником стійкості до хвороби батьківські форми. Гаметофітний добір проводився шляхом нанесення фільтрату культури патогену на приймочку квіток за годину до запилення. Добір зменшив середній процент ураження хворобою та кращій врожай порівняно з контролем у популяціях, що розщеплюються, як у випадку використання гаметофітного добору, так і у випадку використання спорофітного добору. Таким чином, у соняшника існує можливість ефективного використання одночасного проведення гаметофітного та спорофітного доборів на стійкість до хвороб [128]. Також у соняшника існує

можливість проведення гаметофітного добору на стійкість до *Sclerotium bataticola* [129].

Існують дані про успішне проведення пилкової селекції на стійкість картоплі до фітофторозу. На приймочки кастрованих квіток наносили 0,1% розчин 25-добової культуральної рідини гриба. Після того як розчин культуральної рідини проникав у маточку, на приймочку наносили у надлишковій кількості пилок. В якості стійких виділяли сім'ї, у яких кількість насіння у ягодах була вище середнього значення та наближалася до контролю. Потім сіянці перевіряли на інфекційному фоні [130].

Якщо у гібридів  $F_1$  томату проведено гаметофітний добір на холодостійкість, з наступним інфікуванням гібридів  $F_1$  фітофторозом, у їх нащадків вміст сухої речовини збільшується порівняно з контролем, середній бал ураження фітофторозом знижується, індекс розвитку хвороби не вище 50%. Це показує, що гени, які детермінують стійкість рослин томату до фітофторозу, зчеплені з локусами, які контролюють стійкість пилку до пониженої температури на стадіях її проростання та росту пилкових трубок [74].

Було виявлено також, що у сортів томатів, які були заражені грибом *Verticillium dahlia* Kleb., формується пилок, який порівняно з контролем краще проростає на інфекційному фоні. У гібридів  $F_1$ , отриманих з використанням такого пилку, життєздатність пилку інфікованих рослин підвищується у 2,5-10 разів порівняно з контролем. Також інфекція може використовуватись для покращення інших показників рослини. Виявлено, що пилкові зерна інфікованих рослин більш стійкі до підвищеної температури, і, навпаки, в результаті дії високої температури на пилкові зерна отримані нащадки, які при зараженні формують більш життєздатний пилок [74].

Обробка підвищеною температурою пилку томату використовувалась для збільшення стійкості рослин до *V. dahlia* (вертицильозне зав'ядання). Найбільш стійкими виявились рослини, отримані від запилення пилком заражених рослин, який піддавався термообробці [74].

Попереднє зараження рослин також викликає зміни в потомстві, яке вирощується на інфекційному фоні. Таким чином, пилок, що потрапив на

заражену рослину піддається добору на стадії проростання та росту пилкової трубки. Це, в свою чергу, призводить до підвищення загальної адаптивності рослин, зниження кількості рослин, що загинули від ураження. При інфікуванні  $F_1$  томатів у нащадків, що отримані від запилення термостійким пилком, проявляється здатність до кращого росту та накопиченню більшої біомаси. Збільшується мінливість потомства, що розщеплюється, за ознаками загальної пристосованості. У рослин, отриманих від запилення термообробленим пилком, збільшувалась жаростійкість. Також жаростійкість збільшувалась і в варіантах використання термообробленого пилку, який збирався з уражених рослин [74].

У нуту також успішно проведено гаметофітну селекцію на стійкість до зав'ядання. Квітки гібридів  $F_1$  обприскували розчином патотоксину, а популяцію  $F_2$  оцінювали за наявністю у рослин молекулярних маркерів, які представляють собою алелі генів, які детермінують стійкість рослин до захворювання [131].

В популяціях  $F_2$  томатів, що розщеплюються, отриманих в результаті запилення здорових рослин  $F_1$  пилком хворих екземплярів, на комбінованому до головневих захворювань інфекційному фоні виявлені різноманітні реакції на зараження *Ustilago maydis* (Beckm.) Unger та *Sorosporium reilianum* (Kuhn.) Me Alpine. При зараженні пильною головнею у декількох дослідних популяціях ураження рослин *S. reilianum* було нижче ніж у контролі [74].

Гаметофітний добір у вигляді визначення стійкості рослин до збудника фузаріозу на рівні пилку, з подальшим добором у цих рослин проведено у сої [93].

Зрілий пилочок використовувався для виділення стійких сортів цибулі ріпчастої до бактеріозу, що викликається бактеріями *Erwinia carotovora*. Бактеріальну суспензію в різних концентраціях наносили на поверхню живильного середовища з посіяним на ньому пилком та через 2 години препарати продивлялись під мікроскопом та оцінювали за процентом пилкових зерен, що проросли. У кожного сорту спостерігалася залежність зміни життєздатності пилку від бактеріального навантаження: чим вище концентрація бактерій у суспензії, тим менше кількість мікроспор, що проросли. За

характером цих змін сорти були розділені на стійкі та чутливі до даного збудника [132, 133].

Також за допомогою визначення стійкості пилку білокачанної капусти до збудників бактеріозу та кіли можливе проведення подальшого добору з отриманням стійких форм рослин [134].

*Ефективність гаметофітного та спорофітного доборів.* Існують також роботи, які показують більшу ефективність одночасного проведення гаметофітного та спорофітного доборів, ніж окремої дії кожного з них.

Так, Кільчевський та ін. виявили тісну позитивну кореляційну залежність між стійкістю до низьких температур мікрогаметофіта і спорофіта у групі ранньостиглих зразків томату. Було розроблено два режими холодової обробки пилку (1 година при  $-12^{\circ}\text{C}$  та 3 години при  $+1^{\circ}\text{C}$ ), які дозволяють відібрати близько 30% найбільш холодостійких пилкових зерен і забезпечують достатню жорсткість добору. Гібриди  $F_1$ , що отримували від контрастних за холодостійкістю вихідних ліній, запилювали пилком, що витримувався при пониженій температурі. Насіння  $F_2$  пророщували при температурі  $10-12^{\circ}\text{C}$ , холодостійкість визначали за відносним процентом схожості насіння та за відносною масою та довжиною коренів і стебла проростків. Застосування комбінованого добору (за гаметофітом у  $F_1$  та за проростками у  $F_2$ ) виявилось у цих дослідах більш ефективним у порівнянні з добром за гаметофітом в селекції на холодостійкість [9].

Також цими дослідниками було виявлено підвищення холодостійкості томату при циклічному використанні гаметофітного та спорофітного доборів. Холодостійкість проростків, отриманих при циклічному використанні гаметофітного та спорофітного доборів у  $F_5$  підвищилась: за схожістю – на 3,1-44,8%, за масою проростку – на 56,4-104,4, за довжиною кореня – на 120,0-280,0, за довжиною стебла – на 112,5-516,6%.

Холодостійкість проростків, отриманих при використанні тільки гаметофітного добору у  $F_5$  підвищилась: за схожістю – на 19,0-46,3% (крім однієї комбінації схрещування, де холодостійкість була меншою, ніж в

контролі), за масою проростку – на 1,7-42,2, за довжиною кореня – на 53,3-90,0, за довжиною стебла – на 12,5-366,7%.

Аналіз показників холодостійкості на стадії пилку показав, що використання ступінчатого гаметофітно-спорофітного добору сприяє підвищенню стійкості пилку до низьких температур за життєздатністю в 1,3-1,6 рази, за довжиною пилкової трубки – в 0,1-0,5 рази; використання двократного гаметофітного добору підвищує холодостійкість за життєздатністю пилку в 1,1-1,3 рази, за довжиною пилкової трубки – в 1,7-2,4 рази.

При аналізі впливу методів добору за холодостійкістю на рівні спорофіту та гаметофіту на продуктивність виявлено, що найбільш продуктивними виявились зразки, які були отримані в ході ступінчатого використання методів добору за гаметофітом та спорофітом (на 5,9-56,6% за врожайністю) [135].

За допомогою сумісної дії гаметофітного та спорофітного доборів отримали холодостійкий сорт ріпи японської «Снегурочка» [16]. У цьому випадку добір холодостійких генотипів ріпи проводився у вигляді оцінки гаметофіту на холодостійкість, після чого відбирались для розмноження лише рослини з високою холодостійкістю гаметофіту. В подальшому також проводився добір на рівні проростків.

Наведені літературні дані свідчать, що методологія гаметофітного добору успішно розробляється в різних наукових установах світу та використовується на різних етапах селекційного процесу. За допомогою методу пилкового добору вже створено сорти ряду культур. Однак, для соняшника, який є основною олійною культурою в Україні і однією з важливих технічних культур світу, не розроблено ефективної методики проведення гаметофітного добору, особливо на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища, які обмежують ареал його вирощування та в подальшому можуть підвищити свій негативний вплив, через зміну кліматичних умов. Дослідження з розробки методів пилкового добору у соняшника на стійкість до високої температури, посухи та низької температури є актуальними, оскільки дозволять більш ефективно вирішувати завдання, які стоять перед селекцією цієї культури.

## РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Ґрунтово-метеорологічні умови

Лабораторні та вегетаційні досліді проводились на базі кафедри садово-паркового господарства та генетики рослин біологічного факультету Запорізького національного університету, а польові експерименти – на полях сівозміни Інституту олійних культур УААН, який знаходиться на території Запорізького району у північно-західній частині Запорізької області.

Пануючим типом водного режиму ґрунтів є непромивний, при глибокому (більше 10 м) заляганні ґрунтових вод. За даними Запорізької агрохімлабораторії територія Інституту олійних культур представлена типовими звичайними середньоміцнимималогумусними чорноземами. Основні запаси ґрунтової вологи у цих чорноземах формуються у осінньо-зимово-ранньовесняний період.

Кількість гумусу невелика і у шарі 0-20 см коливається у межах 4,4-5,5%. У орному шарі ґрунту забезпеченість легкогідролізуємим азотом – 8,7-9,1 мг на 100 г ґрунту. Вміст рухомого фосфору (за Чириковим) – 10,5-11,2 мг на 100 г ґрунту, обмінного калію (за Масловою) – 15,2-17,1 мг. Ґрунти характеризуються як слабо забезпечені азотом. Реакція ґрунтового розчину нейтральна, рН водної витяжки коливається у межах 6,5-7,0.

Розподіл атмосферних опадів у цій зоні як за кількістю, так і за періодами вегетації, нерівномірний. У зв'язку з чим продуктивність рослин у більшій мірі залежить від накопичення та правильного використання ґрунтової вологи осінньо-зимово-ранньовесняних опадів. Клімат південного степу України помірно-теплий з недостатнім зволоженням. Спостерігається посушливість клімату, яка проявляється частіше літом і восени. Посушливість клімату обумовлюється не тільки недостатньою кількістю опадів, а й нерівномірним розподілом їх на протязі року, особливо у період вегетації рослин та великими витратами на випаровування. Середня кількість опадів за рік складає по Запорізькому району 420 мм. Сума ефективних температур складає 3000-3100°C. Повне відтанення ґрунту відмічається у другій половині березня.

Запаси продуктивної вологи у метровому шарі ґрунту до початку польових робіт у середньому складають 139 мм. Стійке прогрівання ґрунту на глибині 10 см до 10°C відмічається у середині квітня.

Характерною особливістю приходу весни для півдня степу України є швидке нарощування денних температур, яке приривається різким похолоданням у кінці квітня – початку травня і триває 7-12 діб. У подальшому ріст температури повітря проходить з великою інтенсивністю.

Характеристика елементів погоди складена на підставі матеріалів Запорізької метеорологічної станції, розташованої на відстані 8-13 км від місця закладення польових дослідів, а також спостережень метеопоста ІОК. У таблиці 1 представлені метеорологічні умови проведення дослідів, які відіграють важливу роль у життєдіяльності рослин.

Метеорологічні умови у роки досліджень склалися по різному. Виходячи з представлених в таблиці 2.1 даних, можна говорити, що в 2013 році спостерігався брак опадів, супроводжуваний підвищеними для регіону температурами. У 2014 році також протягом періоду вегетації спостерігалася підвищена, у порівнянні з середньобагаторічною, температура. У квітні, червні та вересні спостерігалися рясні опади, що перевищують середньобагаторічний показник. У травні, липні і серпні кількість опадів була нижчою, ніж середньобагаторічні показники, проте тільки в липні спостерігався сильний брак вологи. Температура, кількість опадів та їх розподіл за вегетаційний період соняшника були більш сприятливими у 2014 році.

Агротехніка проведення польових дослідів – загальноприйнята для посівів соняшнику культурного в даній агрокліматичній зоні.

Таблиця 2.1. Погодні умови перед посівом і після посіву соняшника у 2013-2014 роках

| Роки                           | Декада          | Квітень               |           | Травень               |           | Червень               |           | Липень                |           | Серпень               |           | Вересень              |           |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|                                |                 | Середньо-добова t, °C | Опади, мм |
| 2013                           | I               | 10,2                  | 0         | 22,9                  | 0         | 22,3                  | 21,5      | 25,3                  | 68,0      | 25,5                  | 0,0       | 15,5                  | 12,0      |
|                                | II              | 12,6                  | 8,0       | 22,3                  | 25,0      | 25,0                  | 10,0      | 26,6                  | 22,5      | 26,5                  | 0,0       | 18,0                  | 37,0      |
|                                | III             | 16,9                  | 0         | 24,0                  | 4,0       | 26,7                  | 0         | 26,8                  | 0,0       | 23,5                  | 0,0       | 11,2                  | 0,0       |
|                                | Середня t, °C   | 13,2                  | -         | 23,1                  | -         | 24,7                  | -         | 26,2                  | -         | 25,2                  | -         | 14,9                  | -         |
|                                | Сума опадів, мм | -                     | 8,0       | -                     | 29,0      | -                     | 31,5      | -                     | 90,5      | -                     | 0,0       | -                     | 49,0      |
| 2014                           | I               | 7,9                   | 6,4       | 15,8                  | 4,5       | 24,7                  | 30,0      | 24,5                  | 0,0       | 30,1                  | 0,0       | 23,3                  | 0,0       |
|                                | II              | 11,7                  | 13,0      | 21,0                  | 6,5       | 22,2                  | 7,0       | 27,0                  | 8,0       | 27,8                  | 19,0      | 18,9                  | 0,0       |
|                                | III             | 16,8                  | 29,0      | 23,8                  | 24,0      | 20,2                  | 42,5      | 27,8                  | 3,0       | 22,4                  | 12,0      | 13,6                  | 81,0      |
|                                | Середня t, °C   | 12,1                  | -         | 20,2                  |           | 22,4                  |           | 26,4                  |           | 26,8                  |           | 18,6                  |           |
|                                | Сума опадів, мм |                       | 48,4      |                       | 35,0      |                       | 79,5      |                       | 11,0      |                       | 31,0      |                       | 81,0      |
| Середньо-багаторічний показник |                 | 10,1                  | 36,0      | 16,7                  | 42,0      | 20,7                  | 52,0      | 22,4                  | 50,0      | 21,6                  | 41,0      | 16,3                  | 23,0      |

## 2.2. Матеріал

Гібриди F<sub>1</sub> «*virescent*»×«*xantha*», «*virescent*»×«дихотомічне жилкування», «дихотомічне жилкування» ×«обпалений лист», «дихотомічне жилкування» ×«*xantha*», «*xantha*» ×«дихотомічне жилкування», «карлик» ×«*xantha*» використовувалися як експериментальний матеріал. Вихідним матеріалом для отримання гібридів були контрастні за жаростійкістю, холодостійкістю та посухостійкістю мутантні лінії соняшнику культурного, отримані шляхом індукованого мутагенезу в Інституті олійних культур НААНУ(м. Запоріжжя).

Лінія «*xantha*» (рис. 2.1) – мутантний зразок, отриманий шляхом обробки етилметансульфонатом в концентрації 0,02% та експозиції 16 годин зародків 9-10-денного віку лінії ЗЛ95. Характеризується жовто-зеленими сходами і рослинами, на листках яких є яскраві жовто-зелені плями, які перетворюються на некротичні сектори в кінці вегетації. Найбільш чітко ознака «*xantha*» проявляється на стадії дорослої вегетуючої рослини. Рослини в'януть при нестачі вологи [136].



Рис. 2.1. Мутантна лінія «*xantha*».

Мутантний зразок «обпалений лист» (рис. 2.2) характеризуються некротичними ділянками на верхніх листках, які легко розпізнати на пізніх етапах вегетації, і ознаками в'янення в посушливих умовах року. Мутант отримано за допомогою обробки етилметансульфонатом в концентрації 0,02% і експозиції 16 годин зародків 9-10-денного віку на основі лінії ЗЛ95 [136].



Рис. 2.2. Мутантна лінія «обпалений лист».

Лінія «*virescent*» (рис. 2.3) – мутантний зразок, отриманий за допомогою обробки етилметансульфонатом в концентрації 0,5% і експозиції 12 годин зрілого насіння лінії ЗЛ 102. Характеризується яскраво-жовтими верхніми листками в перші тижні свого розвитку (особливо до другої пари справжніх листків), хоча надалі рослини майже повертають собі нормальне зелене забарвлення, але не повністю, і характеризуються досить сильним пригніченням. Рослини за розмірами менші у порівнянні з вихідною лінією. Рослини однокошикові, мають висоту 133-135 см. Кількість листя на стеблі становить 20-21. Довжина листя цієї рослини становить  $21,3 \pm 0,44$  см, ширина –  $18,5 \pm 0,42$  см [25].



Рис. 2.3. Мутантна лінія «*virescent*».

Лінія «дихотомічне жилкування» (рис. 2.4) – мутантний зразок, створений шляхом обробки етилметансульфонатом в концентрації 0,5% та експозиції 6 годин зрілого насіння лінії ЗЛ 9. Має дихотомічне жилкування листя, тобто центральна жилка розвинена слабо, жилки першого порядку в більшості відходять від черешка, а не від центральної жилки. Ця ознака добре виявляється вже на стадії другої пари справжніх листків. Рослини за розмірами менші у порівнянні з вихідною лінією. Кут відхилення бічних жилок від центральної жилки становить 30-35°. Нерідко бічні жилки доходять до краю листової пластинки і навіть виступають за його межі у вигляді зубців або щетинок. Також ці рослини мають значно зменшені довжину і ширину крайових квіток щодо вихідної лінії. Довжина крайових квіток в них становить  $45,6 \pm 1,00$  мм, ширина –  $4,9 \pm 0,21$  мм [25, 137].

Лінія «карлик» (рис. 2.5) – мутантний зразок, отриманий при обробці етилметансульфонатом в концентрації 0,1% і експозиції 12 годин незрілого насіння лінії ЗЛ 169 і характеризується мутантною ознакою значно зменшеного росту. При цьому карликовість обумовлюється сильним укорочуванням міжвузлів, тоді як кількість листя не поступається рослинам контролю. У зв'язку зі зменшеною висотою листки також були меншого розміру, їх черешки розташовувалися більш еректоїдно, а стебло мало сильне опушення. Також

рослина несе мутантну ознаку «бахрома по краю листової пластинки», при цьому краї листків мають чітко виражену гофрованість. Ознака «карлик» чітко визначається на пізніх стадіях вегетації, хоча ідентифікацію можна проводити і на початкових стадіях розвитку. Мутант несе морфологічні ознаки, які характерні для посухостійких рослин, а саме – велику кількість трихом, велику кількість і зменшені розміри основних клітин епідерми листка і замикаючих клітин продихів [25, 137].



Рис. 2.4. Мутантна лінія «дихотомічне жилкування».



Рис. 2.5. Мутантна лінія «карлик».

## 2.3. Методи дослідження

### Загальна схема проведення досліджень:

- оцінка вихідного матеріалу (батьківських компонентів гібридів) на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища;
- отримання гібридів  $F_1$  від схрещування контрастних за стійкістю до абіотичних факторів зовнішнього середовища ліній;
- проведення добору на рівні гаметофіту та отримання покоління  $F_2$ ;
- оцінка покоління  $F_2$  на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища;
- проведення гібридологічного аналізу покоління  $F_2$  за мутантними (маркерними) ознаками;
- оцінка покоління  $F_2$  за деякими кількісними ознаками.

### Оцінка вихідного матеріалу на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища

#### *Визначення посухостійкості вихідних ліній*

Посухостійкість визначали за пригніченням росту проростків. З цією метою насіння протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином  $KMnO_4$ . Потім їх розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при  $150^\circ C$  протягом 1 години. У кожену чашку Петрі наливали по 10 мл дистильованої води. У воду додавався ністатин (250 тис. од. на 1 літр). Закриті чашки поміщали в термостат з температурою  $25 \pm 2^\circ C$  до появи нормально розвинених проростків, у яких довжина зародкового корінця приблизно дорівнює довжині сім'янки. Проростки, що утворилися, по 25 штук розміщували в чашки Петрі. У половину чашок Петрі наливали 10 мл дистильованої води. В іншу – наливали 10 мл 15% -ного розчину сахарози. У дистильовану воду і розчин сахарози додавали ністатин (250 тис. од. на 1 літр). Попередньо розчини кип'ятили протягом 5 хвилин. Закриті чашки поміщали в термостат (термостат електричний сухоповітряний ТС-80М) з температурою  $25 \pm 2^\circ C$  на 72 години. На 6-у добу після пересадки проростки виймали, промивали у воді, зрізали зародкові корінці і вимірювали їх довжину. Потім

зародкові корінці поміщали в бюкси і висушували протягом 3 годин при температурі 80-100°C. Після цього бюкси охолоджували в ексикаторі, зважували і вираховували суху масу корінців. Кожен варіант був представлений двома повторами.

Ступінь придушення ростових процесів (А), при штучній посусі, розраховували за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - середня суха маса зародкового корінця або середня довжина корінців, вирощених в розчині сахарози; b - середня суха маса зародкового корінця або середня довжина корінців, вирощених в дистильованій воді. Чим більше відносна суха маса зародкових корінців або їх довжина після дії осмотика, тим більш посухостійкий генотип [33].

#### *Визначення жаростійкості вихідних ліній*

Жаростійкість визначали за особливостями проростання насіння та довжиною зародкових корінців. З цією метою по 100 насінин кожного генотипу протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином  $KMnO_4$ . Половину насіння поміщали в марлеві вузли з етикеткою всередині і опускали на 10 хвилин у водяну баню з наперед встановленої температурою води  $60 \pm 2^\circ C$ . Потім прогріте насіння, як і насіння, що не піддавалося тепловій обробці, по 25 штук розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при  $150^\circ C$  протягом 1 години. У кожену чашку Петрі наливали по 10 мл дистильованої води. Для запобігання розвитку плісняви в дистильовану воду додається ністатин (250 тис. од. на 1 літр) і протигрибковий препарат «Превікур» (2 мл на 1 літр). Для приготування розчину, таблетку ністатину (500 тис. од.) зважують, кришать, відбирають половину ваги, розчиняють у декількох краплях етилового спирту і розмішують в 1 л води. Потім розчин 5 хвилин кип'ятиться. Після охолодження до розчину додають «Превікур». Закриті чашки поміщали в термостат (термостат електричний сухоповітряний ТС-80М) з температурою  $25 \pm 2^\circ C$  на 5 діб. Потім визначають схожість насіння, розраховуючи відсоток проростання.

Схожість (V) розраховують за формулою:

$$V = (v / p) \times 100\%,$$

де v - число пророслого насіння; p - число посіяного насіння.

Відносну схожість (A), що характеризує жаростійкість, розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де a - схожість після впливу високої температури; b - схожість контролю, що не підлягав впливу теплової обробки.

Чим більше відносна схожість насіння після прогрівання, тим більш жаростійкий генотип [33].

Після визначення відсотку проростання, проростки виймали, промивали у воді, зрізали зародкові корінці і вимірювали їх довжину.

Ступінь придушення ростових процесів (A), після прогрівання насіння, розраховували за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де a – середня довжина зародкових корінців, отриманих після прогрівання насіння; b - середня довжина зародкових корінців, отриманих після пророщування насіння, що не прогрівалося. Чим більше відносна довжина зародкових корінців після прогрівання, тим більш жаростійкий генотип [33].

#### *Визначення холодостійкості вихідних ліній*

Холодостійкість визначали за особливостями проростання насіння та довжиною зародкових корінців. З цією метою по 400 насінин кожного генотипу протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином  $KMnO_4$ . Потім насіння, по 25 штук розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при 150 ° С протягом 1 години. У кожену чашку Петрі додавали по 10 мл дистильованої води. Для запобігання розвитку плісняви в дистильовану воду додається ністатин (250 тис. од. на 1 літр) і протигрибковий препарат «Превікур» (2 мл на 1 літр). Для приготування розчину, таблетку ністатину (500 тис. од.) зважують, кришать, відбирають половину ваги, розчиняють у декількох краплях етилового спирту і розмішують в 1 л води. Потім розчин 5

хвилин кип'ятиться. Після охолодження розчину до нього додають «Превікур». Половину закритих чашок вирощували 5 діб за нормальних температурних умов ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  у електричному сухоповітряному термостаті ТС-80М). Іншу половину закритих чашок поміщали в холодильник при температурі  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  до появи нормально розвинених проростків. Контроль проценту проростання насіння проводили на 13 добу. Потім визначають схожість насіння, розраховуючи відсоток проростання.

Схожість (V) розраховують за формулою:

$$V = (v / p) \times 100\%,$$

де v - число пророслого насіння; p - число посіяного насіння.

Відносну схожість (A), що характеризує холодостійкість, розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де a - схожість після впливу низької температури; b - схожість контролю, що не підлягав впливу низької температури.

Чим більше відносна схожість насіння, під час пророщування при низьких температурах, тим більш холодостійкий генотип [33].

На 28 добу проростки виймали, промивали у воді, зрізали зародкові корінці і вимірювали їх довжину.

Ступінь придушення ростових процесів (A), після пророщування насіння при низьких температурах, розраховували за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де a – середня довжина зародкових корінців, пророщених при низьких температурах; b - середня довжина зародкових корінців, пророщених при нормальних температурних умовах. Чим більше відносна довжина зародкових корінців після пророщення при низьких температурах, тим більш холодостійкий генотип [33].

### **Отримання гібридів F<sub>1</sub>**

Для отримання гібридів F<sub>1</sub> використовували техніку примусового переzapилення. Спочатку визначають рослини, які будуть батьківським та

материнськими формами. Квітки у соняшника двостатеві. Для того, щоб не відбулося самозапилення, проводять кастрацію рослин, що беруться як материнські форми. Потім ці рослини примусово запилюють пилком батьківських форм [138].

Кастрація квіток материнських рослин.

Проводиться видалення недорозвинених пиляків з наступною ізоляцією суцвіть. Кастрацію починають за 1 -3 доби до дозрівання пиляків. Пиляки треба видаляти повністю та в недозрілому стані, щоб не допустити самозапилення. При кастрації намагаються як найменше травмувати квітку. Кастроване суцвіття поміщають в легкий ізолятор з пергаменту або целофану, що не промокає. На ізоляторі простим олівцем пишуть номер комбінації та назву материнської лінії, дату кастрації, фамілію людини, що проводила кастрацію [138].

Збір пилку.

Перед проведенням запилення треба зібрати здоровий пилок з батьківських рослин. Краще всього для запилення використовувати стиглі пиляки. Пилок можна також збирати в коробочки або бюкси. Якщо приймочки не встигли дозріти, а пиляки вже дозріли, пилок збирають та зберігають деякий час в ексикаторі або банці з притертою пробкою [138].

Запилення.

Кастровані квітки материнських рослин запилюють пилком підібраних батьківських, а потім запилені суцвіття ізолюють. Найбільш успішно запилення відбувається при повній стиглості приймочок [138]. Запилення проводили свіжозібраним пилком у ранкові години, коли приймочка найбільш сприйнятлива до пилку та забезпечується найкраще його проростання [138]. Після запилення суцвіття знову ізолюють, на ізоляторі відмічають дату запилення та фамілію робітника [138].

## **Проведення гаметофітного добору та отримання покоління F<sub>2</sub>**

### *Гаметофітний добір на жаростійкість*

Для проведення гаметофітного добору використовували техніку примусового перезаплення. Кастрацію квіток гібридних рослин проводили, видаляючи недорозвинені пиляки з подальшою ізоляцією суцвіть [90]. Перед проведенням запилення в пергаментні пакети збирали зрілий пилок з некастрованих суцвіть гібридних рослин тієї ж комбінації схрещування. Для проведення гаметофітного добору частину свіжозібраного пилку у відкритих пергаментних пакетиках шаром 2-3 мм висотою поміщали в термостат (термостат електричний сухоповітряний ТС-80М) і прогрівали у термостаті в двох режимах при температурі  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 1-ї та 3-х годин. Потім частину кастрованих рослин запилювали прогрітим пилком. У контролі для запилення використовували свіжозібраний пилок. Для запилення використовували приблизно  $1 \text{ см}^3$  пилку на кожний кошик.

### *Гаметофітний добір на холодостійкість*

Для проведення гаметофітного добору використовували техніку примусового перезаплення. Кастрацію квіток гібридних рослин проводили, видаляючи недорозвинені пиляки з подальшою ізоляцією суцвіть [90]. Перед проведенням запилення в пергаментні пакети збирали зрілий пилок з некастрованих суцвіть гібридних рослин тієї ж комбінації схрещування. Для проведення гаметофітного добору частину свіжозібраного пилку об'ємом приблизно  $1 \text{ см}^3$  в пергаментних пакетиках поміщали в холодильник і витримували при температурі  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 7-ми діб. Потім частину кастрованих рослин запилювали пилком, витриманим при низьких температурах. У контролі для запилення використовували свіжозібраний пилок. Для запилення використовували приблизно  $1 \text{ см}^3$  пилку на кожний кошик.

### *Гаметофітний добір на посухостійкість*

Для проведення гаметофітного добору використовували техніку примусового перезаплення. Кастрацію квіток гібридних рослин проводили,

видаляючи недорозвинені пиляки з подальшою ізоляцією суцвіть [90]. Перед проведенням запилення в пергаментні пакети збирали зрілий пилок з некастрованих суцвіть гібридних рослин тієї ж комбінації схрещування. Для проведення гаметофітного добору частину кастрованих кошиків обробляли розчином поліетиленгліколю 6000 (ПЕГ 6000), оббризкуючи їх з бризкалки. Експеримент проводився у двох варіантах. В одному з них використовувався 20%-вий розчин ПЕГ 6000, в іншому – 10%-вий розчин ПЕГ 6000. Після того як кошики просихали, вони запилювалися свіжозібраним пилом [18]. У контролі для запилення використовували кошики оброблені дистильованою водою. Для запилення використовували приблизно 1 см<sup>3</sup> пилку на кожний кошик.

*Визначення життєздатності пилку під дією екстремальних факторів зовнішнього середовища*

Життєздатність пилку соняшника визначають шляхом його пророщування на штучному живильному середовищі. Склад живильного середовища наступний (на 1 літр):

цукроза – 150 г

борна кислота ( $H_3BO_3$ ) – 220 мг

нітрат калію ( $KNO_3$ ) – 200 мг

сульфат магнію ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ ) – 200 мг

нітрат кальцію ( $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ ) – 220 мг

екстракт приймочки – 3 шт

ПЕГ 6000 – 296 г.

Живильне середовище готується послідовним розчиненням компонентів в дистильованій воді. Попередньо у дистильовану воду додають 3 приймочки, які розтирають у посудині з водою [68, 139].

Визначення життєздатності пилку проводять наступним чином. Пилок збирають у пергаментні пакетики у 8-9 годин ранку з квіток, які почали пилити у день збору пилку. Завдяки цьому запобігається збір пилку, який залишився на квітках протягом попередньої доби. Живильне середовище наносять на предметне скло у вигляді великої краплини та розтирають його по поверхні.

Потім свіжозібраний пилок предметною голкою висівають у живильне середовище. Предметне скло розміщують у чашці Петрі на дні якої знаходиться зволожений водою фільтрувальний папір. Закрити чашку Петрі ставлять у термостат з температурою  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  на 1 добу. Потім з використанням світлового мікроскопу продивляються 200-500 пилкових зернин та визначають кількість пилкових зернин, що проросли (пилкова трубка за довжиною складає не менше ніж половину діаметру пилкового зерна). За необхідністю вимірюють довжину пилкових трубок. Процент проростання пилку визначають за формулою:

$$X = (a / b) \times 100\%,$$

де  $a$  – кількість пилкових зернин, що проросли;  $b$  – кількість пилкових зернин, що проросли [68].

Для визначення впливу підвищених температур на життєздатність пилку, свіжозібраний пилок у відкритих пергаментних пакетиках розміщують в термостаті і прогрівають в двох режимах при температурі  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 1-ї та 3-х годин. Далі проведення життєздатності проводиться за вище зазначеною методикою.

Дію низьких температур на пилок визначають пророщенням пилку, який у пергаментних пакетиках зберігався в холодильнику при температурі  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 8-ми діб.

Для визначення впливу посушливих умов на пилок у живильному середовищі для пророщування пилку збільшують концентрацію ПЕГ 6000 до 40% – 50%.

## **Оцінка покоління $F_2$ на стійкість до абіотичних факторів зовнішнього середовища**

### *Визначення жаростійкості популяцій $F_2$*

Для визначення жаростійкості популяцій  $F_2$  частина насіння, отриманого з використанням прогрітого пилку, і насіння, отриманого після запилення рослин свіжозібраним пилом, піддавали прогріванню при температурі  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 15 хвилин у водяній бані. Насіння для прогрівання поміщали в

марлеві вузли з етикеткою всередині і опускали у водяну баню. Потім насіння висівали в полі. У період цвітіння проводили облік рослин, що вижили.

Відсоток рослин, що вижили, (А) розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - число рослин, що вижили; b - число посіяного насіння.

#### *Визначення посухостійкості популяцій F<sub>2</sub> з використанням ПЕГ 6000*

Для визначення посухостійкості популяцій F<sub>2</sub> частину насіння, отриманого з використанням прогрітого пилку та отриманого після обробки кошиків розчином ПЕГ 6000, та частину насіння, отриманого після запилення рослин свіжозібраним пилком, пророщували на 20%-му розчині ПЕГ 6000 за наступною методикою. Насіння протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином *KMnO<sub>4</sub>*. Потім розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при 150°C протягом 1 години. У чашки Петрі наливали по 10 мл 20%-го розчину ПЕГ 6000. У розчин додавали «Превікур» (2 мл на 1 літр) та ністатин (250 тис. од. на 1 літр). Закриті чашки поміщали в термостат з температурою 25±2°C або до появи нормально розвинених проростків, у яких довжина зародкового корінця приблизно дорівнює довжині сім'янки, або на 3 доби. Потім визначали схожість насіння, розраховуючи відсоток проростання.

Схожість (А) розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - число пророслого насіння; b - число посіяного насіння.

Після визначення відсотку проростання, проростки виймали, промивали у воді, зрізали зародкові корінці і вимірювали їх довжину.

Ступінь придушення ростових процесів (А), при пророщуванні насіння на розчині ПЕГ 6000, розраховували за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а – середня довжина зародкових корінців, отриманих при пророщуванні насіння на осмотично активній речовині; b - середня довжина зародкових корінців, отриманих після пророщування насіння на воді. Чим

більше відносна довжина зародкових корінців після прогрівання, тим більш посухостійкий генотип.

#### *Визначення посухостійкості популяції F<sub>2</sub> з використанням цукрози*

Для визначення посухостійкості популяції F<sub>2</sub> частину насіння, отриманого з використанням прогрітого пилку, та частину насіння, отриманого після запилення рослин свіжозібраним пилком, пророщували на 15%-му розчині цукрози за наступною методикою. Насіння протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином *KMnO<sub>4</sub>*. Потім розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при 150°C протягом 1 години. У чашки Петрі наливали по 10 мл 15%-го розчину цукрози. У розчин додавали «Превікур» (2 мл на 1 літр) та ністатин (250 тис. од. на 1 літр). Закриті чашки поміщали в термостат з температурою 25±2°C на 4 доби. Потім визначали схожість насіння, розраховуючи відсоток проростання.

Схожість (А) розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - число пророслого насіння; b - число посіяного насіння.

#### *Визначення холодостійкості популяції F<sub>2</sub>*

Холодостійкість популяції F<sub>2</sub> визначали за особливостями проростання насіння. З цією метою насіння, що було отримано з використанням пилку, витриманого при пониженій температурі, та насіння, що було отримано з використанням свіжозібраного пилку, протруювали 10 хвилин 1%-ним розчином *KMnO<sub>4</sub>*. Потім насіння, по 25 штук розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі, попередньо стерилізовані при 150°C протягом 1 години. У кожену чашку Петрі наливали по 10 мл дистильованої води. Для запобігання розвитку плісняви в дистильовану воду додається ністатин (250 тис. од. на 1 літр) і протигрибковий препарат «Превікур» (2 мл на 1 літр). Для приготування розчину, таблетку ністатину (500 тис. од.) зважують, кришать, відбирають половину ваги, розчиняють у декількох краплях етилового спирту і розмішують в 1 л води. Потім розчин 5 хвилин кип'ятиться. Після охолодження розчину до

нього додають «Превікур». Закриті чашки поміщали в холодильник при температурі  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  до появи нормально розвинених проростків. Потім визначають схожість насіння, розраховуючи відсоток проростання.

Схожість (А) розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - число пророслого насіння; b - число посіяного насіння.

### *Вплив прогрівання пилку на польову схожість популяції F<sub>2</sub>*

Для визначення впливу гаметофітного добору на популяцію F<sub>2</sub> визначали відносну кількість квітучих рослин F<sub>2</sub>, вирощених в польових умовах та отриманих з використанням прогрітого пилку, і порівнювали його з відотною кількістю квітучих рослин F<sub>2</sub>, отриманих від запилення свіжозібраним пилком. Таким чином визначали адаптаційні властивості популяцій, що розщеплюються.

Відносна кількість квітучих рослин (А) розраховують за формулою:

$$A = (a / b) \times 100\%,$$

де а - число квітучих рослин; b - число посіяного насіння.

### **Гібридологічний (маркерний) аналіз покоління F<sub>2</sub> за мутантними ознаками**

Маркерний аналіз в польових умовах популяцій рослин F<sub>2</sub>, отриманих після прогрівання пилку гібридних рослин, проводили, підраховуючи кількість рослин, що несуть маркерну ознаку.

Для проведення маркерного аналізу популяцій F<sub>2</sub>, отриманих з використанням прогрітого пилку та пилку, що проростав в присутності розчину ПЕГ, після пророщування насіння F<sub>2</sub> на розчині ПЕГ 6000 проросле та не проросле насіння окремо висаджували в ящики в умовах фітотрону при оптимальній температурі. На стадії першої-другої пари справжніх листків підраховували частку рослин з маркерною ознакою. Порівнювали дослідні і контрольні популяції F<sub>2</sub>, сформовані спільно з пророслого і не пророслого на

розчині ПЕГ насіння, і дослідні і контрольні популяції  $F_2$ , сформовані лише з пророслого на розчині ПЕГ насіння.

Для проведення маркерного аналізу популяцій  $F_2$ , отриманих з використанням пилку, що витримувався на холоді, після пророщування насіння  $F_2$  при низьких температурах проросле і не проросле насіння окремо висаджували в ящики в умовах фітотрону при оптимальній температурі. На стадії першої-другої пари справжніх листків підраховували частку рослин з маркерною ознакою. Порівнювали дослідні і контрольні популяції  $F_2$ , сформовані спільно з пророслого і не пророслого на холоді насіння, і дослідні і контрольні популяції  $F_2$ , сформовані лише з пророслого на холоді насіння. Також проводили порівняння популяцій  $F_2$ , що склалися з пророслого при низьких температурах насіння, та популяцій  $F_2$ , що склалися з непророслого при низьких температурах насіння, як у контролі, так і у досліді.

### **Оцінка покоління $F_2$ за кількісними ознаками**

Вивчали вплив прогрівання пилку у соняшника на висоту рослин популяцій  $F_2$ . У вересні місяці у всіх рослин контрольних та дослідних популяцій в польових умовах вимірювали висоту та порівнювали дослідні та контрольні популяції за цим показником.

Разом з вивченням зміни середньої висоти рослин в популяціях  $F_2$ , вивчали зміну частки рослин в популяції за класами висоти. Кожну популяцію  $F_2$  розбивали на класи, які становили інтервал в 10 см. В популяціях підраховували кількість рослин в кожному інтервалі та визначали їх відсоток в даній популяції. Потім відсоток рослин в кожному інтервалі у контролі порівнювали з дослідними варіантами.

### **Висів матеріалу**

Висів вихідних ліній, гібридів  $F_1$  та покоління  $F_2$  проводився квадратно-гніздовим способом за схемою  $70 \times 70$  см. В кожному рядку 10 гнізд, відстань між гніздами 70 см. Відстань між рядками 70 см, довжина рядку 7 м. Насіння висівалося ручним способом з використанням саджалки по 2 насінини в гніздо.

## Статистична обробка

### Метод $\chi^2$

Аналіз розщеплення і перевірку гіпотез проводили за критерієм  $\chi^2$  [139, 140]:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E},$$

де  $E$  – теоретично очікувана, а  $O$  – фактично отримана чисельність.

Загальною мірою відхилення фактичних даних від теоретичних, тобто критерій відповідності  $\chi^2$ , буде сума відхилень квадратів різностей між частотами емпіричного та теоретичного розподілів до частот теоретичного розподілу для даної групи [139, 140].

Критерій  $\chi^2$  використовується, коли необхідно визначити відповідність двох рядів розподілу, що порівнюються, а саме – емпіричного та теоретичного або двох емпіричних. Використовується в генетичному аналізі при необхідності впевнитися, чи є відхилення від теоретично очікуваного розщеплення, що було виявлено, відхиленням закономірним або воно лежить в межах можливих випадкових коливань [139, 140].

Критерій  $\chi^2$  використовується при вивченні якісних ознак для оцінки відповідності емпіричних даних певній теоретичній передумові, нульовій гіпотезі ( $H_0$ ). Нульова гіпотеза зводиться до припущення, що розбіжність, яка спостерігається між емпіричними та теоретичними частотами, носить виключно випадковий характер. Гіпотеза відкидається, якщо  $\chi^2_{\text{факт}} \geq \chi^2_{\text{теор}}$ , та не відкидається, якщо  $\chi^2_{\text{факт}} < \chi^2_{\text{теор}}$  [139, 140].

Коли фактичні та теоретичні частоти, що очікуються, повністю збігаються, то  $\chi^2=0$ , а якщо збігання неповне, то  $\chi^2$  буде відрізнятися від нуля і тим більше, чим більше розходження між теоретичними та емпіричними частотами. Граничні значення  $\chi^2$ , при яких нульова гіпотеза приймається, наведені в таблиці. На значення  $\chi^2$  впливають кількість ступенів свободи та рівень значущості [139, 140].

Кількість ступенів свободи легко визначити як кількість «класів», об'єми яких повинні бути відомі, для того щоб підрахувати об'єми всіх класів

виходячи з загального об'єму вибірки. В найбільш типових випадках використання критерію відповідності кількості ступенів свободи визначається по формулі  $(c-1) \times (k-1)$ , де  $c$  – число строк та  $k$  – число колонок в аналітичній таблиці [139, 140, 141].

Рівень значущості відображає ризик того, що ми відкидаємо істину гіпотезу. Розбіжності між теоретичними та фактичними значеннями можуть варіювати в силу випадкових причин, але якщо вірогідність того, що розбіжність випадковими причинами, дуже мала, то гіпотеза відкидається, хоч і не виключено, що вона вірна [139, 140, 141].

Розподіл вірогідних значень випадкових величин  $\chi^2$  є неперервним та асиметричним, він залежить від кількості ступенів свободи та наближається до нормальної кривої по мірі збільшення числа випробувань [139, 140, 141].

При використанні цього критерію бажано мати вибірку, що розподіляється у варіаційний ряд, не менше 50 спостережень, а в кожній теоретично розрахованій групі не менше п'яти спостережень [139, 140, 141].

В дослідженнях за теоретично очікуване розщеплення приймали розщеплення у контролі. Критерій  $\chi^2$  розраховували для покоління  $F_2$ , яке отримували у дослідних варіантах.

### *Критерій Стьюдента*

t-критерій Стьюдента - загальна назва для класу методів статистичної перевірки гіпотез (статистичних критеріїв), заснованих на порівнянні з розподілом Стьюдента. Використовували двовибірковий t-критерій для незалежних вибірок. Для обчислення застосовується наступна формула:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}}}$$

Де  $M_1, M_2$  — середнє арифметичне,  $\sigma_1, \sigma_2$  — стандартне відхилення, а  $N_1, N_2$  — розміри вибірок.

Кількість ступенів свободи розраховують як:  $df = N - 1$  [141].

Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Microsoft Excel.

## РОЗДІЛ 3. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ЖАРОСТІЙКІСТЬ

### 3.1. Стійкість вихідного матеріалу до високих температур

Для визначення різниці між генотипами за жаростійкістю на рівні спорофіту обчислювали відносний процент проростання насіння під впливом підвищеної температури, тобто відношення проценту проростання насіння після прогрівання до проценту проростання насіння, що не прогрівалося (таблиця 3.1). Прогрівання насіння проводили у водяній бані протягом 10 хвилин при температурі  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Потім прогріте та не прогріте насіння окремо пророщували у чашках Петрі протягом 5 діб при температурі  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Таблиця 3.1. Відносний процент проростання насіння після його прогрівання у різних мутантних генотипів соняшника

| Генотип                | Процент проростання у контролі | Процент проростання у досліді | Відносний процент проростання |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Дихотомічне жилкування | 95                             | 74                            | $77,9\pm 2,93$                |
| <i>Xantha</i>          | 85                             | 44,0                          | $51,8\pm 3,53$                |
| Карлик                 | 54,5                           | 24,5                          | $45,0\pm 3,52$                |
| Обпалений лист         | 96                             | 54,0                          | $56,3\pm 3,51$                |

Як видно з таблиці 3.1, найбільший відносний процент проростання насіння після прогрівання мала лінія «дихотомічне жилкування». Інші генотипи значно поступалися за цим показником. Найменшим відносним процентом проростання характеризувався мутант «карлик». Генотипи «*xantha*» та «обпалений лист» мали приблизно однакові показники, однак останній мав трохи вищий відносний процент проростання насіння після прогрівання. Для визначення істотності різниці між дослідженими зразками, вони були порівняні між собою за допомогою критерію Стьюдента (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2. Відмінності між генотипами за відносним процентом проростання насіння (критерій Стьюдента)

| Генотип                | Дихотомічне жилкування | <i>Xantha</i> | Карлик  | Обпалений лист |
|------------------------|------------------------|---------------|---------|----------------|
| Дихотомічне жилкування | –                      | 5,69***       | 7,18*** | 4,72***        |
| <i>Xantha</i>          | 5,69***                | –             | 1,36    | 0,90           |
| Карлик                 | 7,18***                | 1,36          | –       | 2,27*          |
| Обпалений лист         | 4,72***                | 0,90          | 2,27*   | –              |

Примітка: \*, \*\*\* – відмінності суттєві при  $p = 0,05$  та  $p = 0,001$ .

З представлених вище даних можна побачити, що лінія «дихотомічне жилкування» дійсно істотно відрізняється від інших генотипів та суттєво перевищує їх за показником відносного проценту проростання насіння після прогрівання. Мутант «обпалений лист» при 5%-вому рівні значущості відрізняється від мутанту «карлик» та перевищує його за цим показником. Однак лінія «*xantha*» не відрізняється за відносним процентом проростання насіння після прогрівання від обох зразків «карлик» та «обпалений лист».

Другим методом для оцінки жаростійкості було визначення відносної довжини зародкових корінців, яка визначалася відношенням середньої довжини зародкових корінців, отриманих після прогрівання насіння, до середньої довжини зародкових корінців у контролі (таблиця 3.3). Вимірювали довжину зародкових корінців на 5 добу пророщування прогрітого та не прогрітого насіння.

Дані, що представлені у таблиці 3.3, показують, що найбільшу відносну довжину зародкових корінців мала лінія «дихотомічне жилкування», у якій вона у досліді перевищувала відповідний показник у контролі. Також високе значення (92,2%) відносної довжини зародкових корінців у досліді порівняно з контролем мав генотип «карлик». Найменшим значенням за цим показником характеризувався мутант «обпалений лист», який мав всього 36,9% довжини

зародкових корінців у досліді порівняно з контролем. Лінія «*xantha*» мала вищий показник, ніж зразок «обпалений лист», проте значно поступалася лінії «карлик». Для визначення істотності різниць між генотипами було розраховано критерій Стьюдента (таблиця 3.4).

Таблиця 3.3. Відносна довжина зародкових корінців після прогрівання насіння у різних мутантних генотипів соняшника

| Генотип                | Середня довжина зародкових корінців у контролі, мм | Середня довжина зародкових корінців у досліді, мм | Відносна середня довжина зародкових корінців, % |
|------------------------|--|---|---|
| Дихотомічне жилкування | 4,88±0,38  | 6,18±0,56   | 126,6±5,81                                      |
| <i>Xantha</i>          | 12,55±0,86   | 6,25±1,85   | 49,8±8,01                                       |
| Карлик                 | 8,10±0,57  | 7,47±1,22   | 92,2±4,43                                       |
| Обпалений лист         | 21,66±1,34   | 8,00±7,00   | 36,9±9,75                                       |

Таблиця 3.4. Відмінності між генотипами за відотною довжиною зародкових корінців (критерій Стьюдента)

| Генотип                | Дихотомічне жилкування | <i>Xantha</i> | Карлик  | Обпалений лист |
|------------------------|------------------------|---------------|---------|----------------|
| Дихотомічне жилкування | –                      | 7,76***       | 4,71*** | 7,90***        |
| <i>Xantha</i>          | 7,76***                | –             | 4,63*** | 1,02           |
| Карлик                 | 4,71***                | 4,63***       | –       | 5,16***        |
| Обпалений лист         | 7,90***                | 1,02          | 5,16*** | –              |

Примітка: \*\*\* – відмінності суттєві при  $p = 0,999$ .

Порівняння за допомогою критерію Стьюдента показало, що лінія «дихотомічне жилкування» дійсно істотно перевищує за показником відносної довжини зародкових корінців після прогрівання насіння усі інші генотипи.

Зразок «карлик» істотно поступається за цим показником мутанту «дихотомічне жилкування», але істотно перевищує інші лінії. Генотипи «*xantha*» та «обпалений лист» характеризуються істотно нижчою відносною довжиною зародкових корінців та не відрізняються одна від одної.

З наведених у таблицях 3.1-3.4 даних можна зробити загальний висновок, що окремі мутантні зразки, які представлені у роботі, відрізняються один від одного за жаростійкістю на рівні спорофіту. Розподілити вихідний матеріал у порядку зростання жаростійкості можна наступним чином: «обпалений лист» та «*xantha*», «карлик», «дихотомічне жилкування». Лінія «дихотомічне жилкування» має найкращі значення за обома показниками. Зразки «*xantha*» та «обпалений лист» не відрізняються ні за відносним процентом проростання насіння після прогрівання, ні за відносною довжиною зародкових корінців. Мутант «карлик» має значно вищий показник за відносною довжиною зародкових корінців ніж мутанти «*xantha*» та «обпалений лист», хоча і поступається зразку «обпалений лист» за відносним процентом проростання насіння після прогрівання. Проте слід зазначити, що істотність різниці між мутантами «карлик» та «обпалений лист» вища за показником відносної довжини зародкових корінців, а також, що лінія «карлик» за показником відносного проценту проростання насіння після прогрівання не відрізняється від лінії «*xantha*», яка, в свою чергу, не відрізняється за цим показником від лінії «обпалений лист». Саме тому пріоритет для розподілу лінії «карлик» у ряду жаростійких генотипів надано саме показнику відносної довжини зародкових корінців, оскільки різниця в цьому випадку виражена більш чітко.

Для проведення досліджень з гаметофітного добору на жаростійкість були одержані гібриди  $F_1$ , батьківські компоненти яких були контрастні за стійкістю до підвищених температур. Було створено гібриди  $F_1$  наступних комбінацій схрещування: «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист», «дихотомічне жилкування» × «*xantha*», «*xantha*» × «дихотомічне жилкування», «*xantha*» × «карлик». Крім цього було також одержано гібриди  $F_1$  комбінацій схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування», «*virescent*» × «*xantha*», у

яких жаростійкість одного з батьківських компонентів, а саме лінії «*virescent*», не визначалася.

### 3.2. Вплив прогрівання пилку соняшника на його проростання на штучному середовищі

Вивчення впливу прогрівання пилку на його проростання на штучному середовищі проводили з метою визначення ефективності дії екстремального фактору та підбору найбільш дієвих експозицій та температур для проведення гаметофітного добору (табл. 3.5).

Таблиця 3.5. Вплив прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> на процент проростання пилкових зерен на штучному середовищі

| Варіант                             | Повторність | Кількість проаналізованих пилкових зерен, шт. | Пророслих пилкових зерен, шт. | Процент проростання пилку | Середній процент проростання пилку |
|-------------------------------------|-------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Контроль                            | 1           | 414   | 102                           | 24,6±2,12                 | 26,3±1,59                          |
|                                     | 2           | 353   | 100                           | 28,3±2,40                 |                                    |
| Прогрівання пилку протягом 1 години | 1           | 380   | 26                            | 6,8±1,30                  | 6,6±0,90***                        |
|                                     | 2           | 391   | 25                            | 6,4±1,24                  |                                    |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин  | 1           | 311   | 3                             | 1,0±0,55                  | 1,0±0,39***. ###                   |
|                                     | 2           | 312   | 3                             | 1,0±0,55                  |                                    |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,001$ ; ### – відмінності між дослідними варіантами істотні при  $p \leq 0,001$ .

Для досліджень підбирали гібриди, батьківські компоненти яких були контрастні за жаростійкістю. Лише в такому випадку можна було забезпечити достатню гетерогенність пилку за стійкістю до високих температур. У таблиці 3.5 наведені дані, які показують життєздатність пилку після його прогрівання, у одного з таких гібридів, а саме гібриду F<sub>1</sub> «дихотомічне жилкування» × «*xantha*».

Представлені у таблиці результати показують, що обидва режими прогрівання істотно зменшують процент проростання пилку на штучному середовищі. Прогрівання пилку протягом 1 години при 60±2°C зменшує процент проростання майже у 4 рази, а прогрівання протягом 3 годин — більше ніж у 20 разів, при цьому проростання пилку знижувалось до 1% (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1. Життєздатність пилку гібриду F<sub>1</sub> «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» після прогрівання протягом 1 години (по центру) та 3 годин (праворуч) у порівнянні з контролем (ліворуч).

Такі результати дозволяють стверджувати, що обидва режими є ефективними та можуть бути використані для проведення гаметофітного добору на жаростійкість. Очікувалося, що прогрівання пилку може селективно впливати на чоловічий гаметофіт та елімінувати не стійкі до підвищеної температури гамети, що в подальшому може призвести до підвищення жаростійкості популяцій рослин F<sub>2</sub>.

### 3.3. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на генетичну структуру популяцій F<sub>2</sub> та їх стійкість до високих температур

#### *Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на жаростійкість популяцій F<sub>2</sub>*

У всіх варіантах схрещування, як у контрольних популяцій, так і у популяцій, створених з використанням гаметофітного добору на жаростійкість, спостерігалось суттєве зменшення виживання рослин після прогрівання насіння (таблиці 3.6, 3.7). Такі результати, можуть бути пов'язані з тим, що при прогріванні насіння виживали найбільш жаростійкі генотипи, концентрація яких в популяціях F<sub>2</sub> досить мала. Так, наприклад, в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» виживання рослин після прогрівання насіння знижувалося в 3-10 разів залежно від варіанту експерименту.

Таблиця 3.6. Виживання рослин F<sub>2</sub> після прогрівання насіння в різних варіантах експерименту за пилковим добором (2013 рік)

| Варіант експерименту   | Обробка насіння | Насіння F <sub>2</sub> посіяно, шт. | Насіння F <sub>2</sub> проросло, шт. | Виживання, % |
|--|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 1  | 2               | 3                                   | 4                                    | 5            |
| <i>F<sub>2</sub> «virescent» × «xantha»</i>                      |                 |                                     |                                      |              |
| Контроль   | без прогрівання | 168                                 | 75                                   | 44,6±3,84    |
|  | прогрівання     | 414                                 | 15                                   | 3,6±0,92***  |
| Прогрівання пилку протягом 1 години                              | без прогрівання | 105                                 | 55                                   | 52,4±4,87    |
|  | прогрівання     | 144                                 | 42                                   | 29,2±3,79*** |
| <i>F<sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист»</i> |                 |                                     |                                      |              |
| Контроль   | без прогрівання | 137                                 | 81                                   | 59,1±4,20    |
|  | прогрівання     | 884                                 | 31                                   | 3,5±0,62***  |
| Прогрівання пилку протягом 1 години                              | без прогрівання | 540                                 | 395                                  | 73,1±1,91    |
|  | прогрівання     | 912                                 | 43                                   | 4,7±0,70***  |

| 1  | 2               | 3   | 4   | 5            |
|--|-----------------|-----|-----|--------------|
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>3 годин                           | без прогрівання | 154 | 103 | 66,9±3,79    |
|  | прогрівання     | 605 | 113 | 18,7±1,59*** |
| <i>F</i> <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » |                 |     |     |              |
| Контроль   | без прогрівання | 250 | 167 | 66,8±2,98    |
|  | прогрівання     | 864 | 56  | 6,5±0,84***  |
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>1 години                          | без прогрівання | 514 | 469 | 91,2±1,25    |
|  | прогрівання     | 827 | 243 | 29,4±1,58*** |
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>3 годин                           | без прогрівання | 18  | 14  | 77,8±9,80    |
|  | прогрівання     | 543 | 128 | 23,6±1,82*** |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності між варіантами з не прогрітим і прогрітим насінням істотні при  $p \leq 0,05, 0,01, 0,001$  відповідно.

Таблиця 3.7. Вживання рослин *F*<sub>2</sub> після прогрівання насіння в різних варіантах експерименту за пилковим добром (2014 рік)

| Варіант експерименту                               | Обробка насіння | Насіння <i>F</i> <sub>2</sub> посіяно, шт. | Насіння <i>F</i> <sub>2</sub> проросло, шт. | Вживання, %  |
|--|-----------------|--|---|--------------|
| 1  | 2               | 3  | 4   | 5            |
| <i>F</i> <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «карлик» |                 |  |   |              |
| Контроль   | без прогрівання | 236  | 116   | 49,2±3,25    |
|  | прогрівання     | 526  | 100   | 19,0±1,71*** |
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>3 годин           | без прогрівання | 287  | 117   | 40,8±2,9     |
|  | прогрівання     | 458  | 79  | 17,2±1,76*** |

| 1  | 2               | 3    | 4   | 5           |
|--|-----------------|------|-----|-------------|
| $F_2$ «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » |                 |      |     |             |
| Контроль   | без прогрівання | 156  | 74  | 47,4±4,00   |
|  | прогрівання     | 462  | 2   | 0,4±0,29*** |
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>1 години          | без прогрівання | 49   | 16  | 32,7±6,7    |
|  | прогрівання     | 181  | 11  | 6,1±1,78*** |
| Прогрівання<br>пилку<br>протягом 3 годин           | без прогрівання | 693  | 438 | 63,2±1,83   |
|  | прогрівання     | 1162 | 3   | 0,3±0,16*** |
| $F_2$ « <i>xantha</i> » × «дихотомічне жилкування» |                 |      |     |             |
| Контроль   | без прогрівання | 192  | 36  | 18,8±2,82   |
|  | прогрівання     | 806  | 16  | 2,0±0,49*** |
| Прогрівання<br>пилку протягом<br>1 години          | без прогрівання | 566  | 174 | 30,7±1,94   |
|  | прогрівання     | 1223 | 30  | 2,5±0,45*** |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності між варіантами з не прогрітим і прогрітим насінням істотні при  $p \leq 0,05, 0,01, 0,001$  відповідно.

Для порівняння жаростійкості популяцій  $F_2$ , отриманих як з використанням (дослідні варіанти), так і без використання (контроль) гаметофітного добору, враховували виживання рослин після температурної обробки насіння. Дані порівняння показані в таблицях 3.8 і 3.9.

Як видно з таблиць 3.8 і 3.9, в комбінаціях схрещувань «*virescent*» × «*xantha*» та «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» в результаті прогрівання пилку гібридів  $F_1$  протягом 1 години виживання рослин популяцій  $F_2$  було істотно вище, ніж у контролі, де для запилення гібридів  $F_1$  використовувався не прогрітий пилок.

Таблиця 3.8. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на жаростійкість популяції спорофітів F<sub>2</sub> (2013 рік)

| Комбінація схрещування                                      | Варіант       | Прогрітого насіння F <sub>2</sub> посіяно, шт. | Прогрітого насіння F <sub>2</sub> зійшло, шт. | Виживання, %     |
|---|---------------|--|---|------------------|
| F <sub>2</sub> « <i>virescent</i> » × « <i>xantha</i> »     | Контроль      | 414  | 15  | 3,6±0,92         |
|   | 60°C/1 година | 144  | 42  | 29,2±3,79***     |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист»  | Контроль      | 884  | 31  | 3,5±0,62         |
|   | 60°C/1 година | 912  | 43  | 4,7±0,70         |
|   | 60°C/3 години | 605  | 113   | 18,7±1,59***.### |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » | Контроль      | 864  | 56  | 6,5±0,84         |
|   | 60°C/1 година | 827  | 243   | 29,4±1,58***     |
|   | 60°C/3 години | 543  | 128   | 23,6±1,82***.#   |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,05$ , 0,01, 0,001 відповідно; #, ##, ### – відмінності між дослідними варіантами істотні при  $p \leq 0,05$ , 0,01, 0,001 відповідно.

Прикладом може слугувати збільшення більш ніж у 8 разів виживання рослин у дослідній популяції F<sub>2</sub> порівняно з контролем в комбінації схрещування «*virescent*» × «*xantha*» та в 4,5 рази в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*». Така ж закономірність виявлена і при використанні в запиленні пилку, прогрітого протягом 3 годин. Так, наприклад, виживання рослин у дослідній популяції F<sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист» перевершувала контрольний варіант більш ніж у 5 разів, а в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» виживання рослин дослідної популяції F<sub>2</sub> було більш ніж в 3,5 рази вище, ніж у контролі. Це вказує на збільшення кількості жаростійких генотипів в популяціях F<sub>2</sub>, отриманих при використанні гаметофітного добору.

Таблиця 3.9. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на жаростійкість популяції спорофітів F<sub>2</sub> (2014 рік)

| Комбінація схрещування                                      | Варіант       | Прогрітого насіння F <sub>2</sub> посіяно, шт. | Прогрітого насіння F <sub>2</sub> зійшло, шт. | Виживання, %          |
|---|---------------|--|---|-----------------------|
| F <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «карлик»                 | Контроль      | 526  | 100   | 19,0±1,71             |
|   | 60°C/3 години | 458  | 79  | 17,2±1,76             |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » | Контроль      | 462  | 2   | 0,4±0,29              |
|   | 60°C/1 година | 181  | 11  | 6,1±1,78*             |
|   | 60°C/3 години | 1162   | 3   | 0,3±0,16 <sup>#</sup> |
| F <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «дихотомічне жилкування» | Контроль      | 806  | 16  | 2,0±0,49              |
|   | 60°C/1 година | 1223   | 30  | 2,5±0,45              |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,05, 0,01, 0,001$  відповідно; #, ##, ### – відмінності між дослідними варіантами істотні при  $p \leq 0,05, 0,01, 0,001$  відповідно.

Однак ми також бачимо, що в наступному році в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» прогрівання пилку протягом 3 годин виявилось не ефективним, що може говорити про недостатню стабільність такого добору. Разом з тим, в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист» прогрівання пилку протягом 1 години було не ефективним і забезпечувало позитивний результат тільки при використанні 3-годинного температурного впливу на пилки. Також ми бачимо, що в комбінаціях схрещування «*xantha*» × «карлик» та «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» прогрівання пилку не збільшило жаростійкість спорофітної популяції F<sub>2</sub>. Очевидно, що для найбільш ефективного відбору генотипів,

стійких до несприятливих факторів, слід до кожної комбінації схрещування підбирати свою жорсткість відбору пилку.

*Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на адаптаційні властивості популяції F<sub>2</sub>*

Для вивчення впливу добору жаростійкого пилку у гібридів F<sub>1</sub> на адаптаційні властивості популяції спорофітів F<sub>2</sub> було проведено порівняння в них кількості рослин, отриманих в результаті температурної обробки пилку (дослід) і без її прогрівання (контроль), що вирости в умовах посухи 2013 року та підвищеної температури 2013-2014 років (таблиця 2.1). При цьому прогрівання насіння в обох випадках не проводили (таблиці 3.10, 3.11).

Таблиця 3.10. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на польову схожість популяції спорофітів F<sub>2</sub> (2013 рік)

| Комбінація схрещування                                     | Варіант       | Насіння F <sub>2</sub> посіяно, шт. | Насіння зійшло, шт. | Кількість рослин, % |
|--|---------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| F <sub>2</sub> «virescent» × «xantha»                      | Контроль      | 168                                 | 75                  | 44,6±3,84           |
|  | 60°C/1 година | 105                                 | 55                  | 52,4±4,87           |
|  | 60°C/3 години | 91                                  | 33                  | 36,3±5,04           |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист» | Контроль      | 137                                 | 81                  | 59,1±4,20           |
|  | 60°C/1 година | 540                                 | 395                 | 73,1±1,91**         |
|  | 60°C/3 години | 154                                 | 103                 | 66,9±3,79           |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «xantha»         | Контроль      | 250                                 | 167                 | 66,8±2,98           |
|  | 60°C/1 година | 514                                 | 469                 | 91,2±1,25***        |
|  | 60°C/3 години | 18                                  | 14                  | 77,8±9,80           |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності від контролю істотні при p≤0,05, 0,01, 0,001 відповідно.

Таблиця 3.11. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на польову схожість популяцій спорофітів F<sub>2</sub> (2014 рік)

| Комбінація схрещування                                      | Варіант       | Насіння F <sub>2</sub> посіяно, шт. | Насіння зійшло, шт. | Кількість рослин, % |
|---|---------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| F <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «карлик»                 | Контроль      | 236                                 | 116                 | 49,2±3,25           |
|   | 60°C/3 години | 287                                 | 117                 | 40,8±2,9            |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » | Контроль      | 156                                 | 74                  | 47,4±4,00           |
|   | 60°C/1 година | 49                                  | 16                  | 32,7±6,7            |
|   | 60°C/3 години | 693                                 | 438                 | 63,2±1,83*          |
| F <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «дихотомічне жилкування» | Контроль      | 192                                 | 36                  | 18,8±2,82           |
|   | 60°C/1 година | 566                                 | 174                 | 30,7±1,94***        |
|   | 60°C/3 години | 36                                  | 5                   | 13,9±5,77           |

Примітка: \*, \*\*, \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,05$ ,  $0,01$ ,  $0,001$  відповідно.

З таблиці 3.10 видно, що в комбінаціях схрещування «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист» і «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» кількість рослин в популяціях F<sub>2</sub>, отриманих після прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> протягом 1 години, була значно вище, ніж в контрольних популяціях. Це вказує на збільшення посухостійкості рослин відповідних популяцій F<sub>2</sub> в даних варіантах температурної обробки пилку, про що свідчать посушливі умови 2013 року.

В комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист» і «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» кількість рослин в популяції F<sub>2</sub>, отриманої після прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> протягом 1 години, була значно вище, ніж у контрольній популяції (таблиця 3.11). Подібний результат спостерігався в комбінації схрещування «*xantha*» × «карлик» у 2014 році, проте

в даному випадку ефективною була обробка пилку протягом 3 годин. У комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» в 2013 році ефективною виявилася обробка пилку протягом 1 години, на що вказувала велика польова схожість дослідних популяцій. Однак у 2014 році така обробка виявилася не ефективною, в той час як саме 3 годинне прогрівання пилку забезпечило позитивний результат. Це може пояснюватися тим, що в 2013 році через маленьку вибірку різниця між контролем і дослідним варіантом, де пилки прогрівалися протягом 3 годин, виявилася не достатньою, хоча тенденція до збільшення схожості дослідної популяції спостерігалася. У комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» в 2014 році температурна обробка пилку протягом 1 години також виявилася ефективною і значно збільшила польову схожість дослідної популяції в порівнянні з контролем.

Збільшення польової схожості дослідних популяцій порівняно з контролем вказує на збільшення адаптаційних властивостей в умовах посухи та підвищеної температури рослин відповідних популяцій  $F_2$  у вище зазначених варіантах температурної обробки пилку.

#### *Вплив прогрівання пилку гібридів $F_1$ на посухостійкість популяцій $F_2$*

Пилковий добір на жаростійкість також впливав на посухостійкість популяцій спорофітів  $F_2$ . Про це свідчить порівняння схожості насіння  $F_2$ , отриманого після запилення прогрітим пилком, і насіння  $F_2$ , отриманого після запилення свіжозібраним пилком, при його пророщуванні на 15%-му розчині цукрози протягом 4 діб (таблиця 3.12).

Прогрівання пилку гібриду  $F_1$  комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» впливало не тільки на жаростійкість, але й на посухостійкість спорофітів  $F_2$ . На це вказує значне збільшення проростання насіння  $F_2$ , отриманого в результаті запилення гібриду  $F_1$  прогрітим протягом 1 години пилком, при пророщуванні на розчині цукрози в порівнянні з контрольним варіантом, де запилення гібриду  $F_1$  проводили свіжозібраним пилком.

Таблиця 3.12. Вплив прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» на посухостійкість спорофітної популяції F<sub>2</sub> (2013 рік)

| Обробка пилку                                | Насіння F <sub>2</sub> , що проростало під дією осмотика, шт. |          | Процент проростання, % |
|--|---|----------|------------------------|
|  | всього  | проросло |                        |
| Свіжозібраний пилок                          | 480   | 43       | 9,0±1,31               |
| Прогрівання пилку при 60°C протягом 1 години | 806   | 454      | 56,3±1,75***           |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,001$ ;

У дослідному варіанті даний показник досягав 56,3%, у той час як у контролі він становив майже у п'ять разів менше. Наведені дані вказують на значне збільшення посухостійкості популяції F<sub>2</sub> після проведення гаметофітного добору на жаростійкість.

Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>2</sub> соняшника на посухостійкість популяцій F<sub>2</sub> також вивчали, пророщуючи насіння F<sub>2</sub> комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування», яке було отримано після запилення прогрітим пилом, та контрольного насіння тієї ж комбінації схрещування на 20%-му розчині ПЕГ 6000 (таблиця 3.13).

Як видно з представлених даних, прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» значно збільшило процент проростання насіння F<sub>2</sub>, отриманого після запилення прогрітим пилом, при пророщуванні на розчині ПЕГ 6000 порівняно з популяцією F<sub>2</sub>, де для запилення використовували свіжозібраний пилок. Таким чином, ми можемо стверджувати, що в даному випадку прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> збільшило посухостійкість популяції F<sub>2</sub>.

Таблиця 3.13. Вплив прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» на посухостійкість спорофітної популяції F<sub>2</sub>

| Обробка пилку                           | Всього насіння F <sub>2</sub> , шт. | Проросло насіння F <sub>2</sub> , шт. | Процент проростання |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Контроль (свіжозібраний пилок)          | 156                                 | 30                                    | 19,2±3,15%          |
| Витримування при 60°C протягом 1 години | 165                                 | 97                                    | 58,8±3,83%***       |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю суттєві при  $p = 0,999$ .

Збільшення посухостійкості популяцій F<sub>2</sub> після проведення гаметофітного добору на жаростійкість можна пояснити тим, що під час прогрівання у сухоповітряному термостаті значно знижується вологість повітря, що може впливати на пилок як фактор добору. Також такі результати можна пояснити тим, що гени, які відповідають за жаростійкість та посухостійкість, можуть бути зчеплені, а отже добір за одними з них може призвести і до зміни другого показника.

*Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на генетичну структуру популяцій F<sub>2</sub> за маркерними мутантними ознаками*

Для визначення суттєвості змін генетичної структури популяцій F<sub>2</sub>, отриманих шляхом гаметофітного добору на жаростійкість, розраховували  $\chi^2$ , де в якості модельного використовували розщеплення, що спостерігається в контрольній популяції F<sub>2</sub>, яка була отримана без прогрівання пилку. Аналіз популяцій F<sub>2</sub>, отриманих від запилення рослин F<sub>1</sub> прогрітим при 60±2°C пилом, показав, що температурна обробка не приводила до зміни генетичної структури останніх за жодною з вивчених маркерних ознак в жодній з досліджених комбінацій схрещування (таблиця 3.14).

Таблиця 3.14. Вплив прогрівання пилку гібридів F<sub>1</sub> на структуру популяцій F<sub>2</sub> за маркерними ознаками «*virescent*» та «дихотомічне жилкування»

| Варіант експерименту  | Рослини без маркерної ознаки, шт. | Рослини з маркерною ознакою, шт. | Розщеплення | $\chi^2$ |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|-------------|----------|
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист»<br>(маркерна ознака «дихотомічне жилкування»)  |                                   |                                  |             |          |
| Контроль  | 61                                | 20                               | 3,05:1      | -        |
| Прогрівання пилку протягом 1 години   | 297                               | 98                               | 3,03:1      | 0,003    |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин  | 84                                | 19                               | 4,42:1      | 2,2      |
| F <sub>2</sub> «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> »<br>(маркерна ознака «дихотомічне жилкування») |                                   |                                  |             |          |
| Контроль  | 131                               | 36                               | 3,64:1      | -        |
| Прогрівання пилку протягом 1 години   | 362                               | 107                              | 3,4:1       | 0,4      |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин  | 12                                | 2                                | 6:1         | 0,4      |
| F <sub>2</sub> « <i>virescent</i> » × « <i>xantha</i> »<br>(маркерна ознака « <i>virescent</i> »)         |                                   |                                  |             |          |
| Контроль  | 55                                | 20                               | 2,75:1      | -        |
| Прогрівання пилку протягом 1 години   | 45                                | 10                               | 4,5:1       | 2,0      |

Примітка:  $\chi^2_{0,05} (df=1) = 3,84$ .

Так, в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*», де популяція рослин F<sub>2</sub> аналізувалася за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування», значення  $\chi^2$  для популяцій отриманих після прогрівання пилку протягом 1-ї та 3-ох годин дорівнювало 0,4 і було недостатнім для підтвердження змін у генетичній структурі популяції при прогріванні пилку. Аналогічну картину спостерігали і в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «обпалений лист», де аналіз проводився за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування», і в комбінації схрещування «*virescent*» × «*xantha*», де маркерний аналіз проводився за ознакою «*virescent*». Таким чином, можна говорити про те, що гени, які детермінують вивчені маркерні ознаки, очевидно, не зчеплені з генами, які відповідають за стійкість рослин до підвищеної температури.

Також проводили вивчення зміни структури популяцій F<sub>2</sub>, отриманих з використанням прогрітого пилку гібридів F<sub>1</sub>, після пророщування насіння F<sub>2</sub> на розчині осмотику (20%-го розчину ПЕГ 6000). Для маркерного аналізу брали всі рослини, які зійшли на фітотроні, як ті, що не проросли на розчині осмотику, так і ті, що проросли під впливом екстремального фактору. Дані цих досліджень представлені у таблиці 3.15. У досліді було використано гібрид F<sub>1</sub> комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування». Маркерний аналіз проводився за обома ознаками.

Представлені у таблиці 3.15 дані показують, що за маркерною ознакою «*virescent*» дослідна та контрольна популяції F<sub>2</sub> не відрізняються. Таким чином, можна говорити, що і в цьому випадку ми не спостерігаємо зміни генетичної структури популяції F<sub>2</sub> під впливом гаметофітного добору на жаростійкість. Проте за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» у рослин, що були одержані при пророщуванні насіння F<sub>2</sub>, отриманого після запилення прогрітим пилком, на розчині ПЕГ 6000, ми спостерігаємо значну зміну генетичної структури популяції порівняно з популяцією рослин, які були отримані після пророщування на осмотику насіння F<sub>2</sub> у варіанті з запиленням свіжозібраним пилком. Прогрівання пилку збільшувало кількість рослин, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування».

Таблиця 3.15. Вплив прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» на розщеплення за маркерними ознаками в поколінні F<sub>2</sub>

| Варіант                                  | Рослини F <sub>2</sub> без маркерної ознаки, шт. | Рослини F <sub>2</sub> з маркерною ознакою, шт. | Всього рослин F <sub>2</sub> , шт. | Розщеплення | $\chi^2$      |
|--|--|---|------------------------------------|-------------|---------------|
| Маркерна ознака « <i>virescent</i> »     |  |   |                                    |             |               |
| Контроль (свіжозібраний пилочок)         | 111  | 27  | 138                                | 4,1:1       | –             |
| Витримування при 60°C протягом 1 години  | 127  | 23  | 150                                | 5,5:1       | $\chi^2=1,74$ |
| Маркерна ознака «дихотомічне жилкування» |  |   |                                    |             |               |
| Контроль (свіжозібраний пилочок)         | 112  | 25  | 137                                | 4,5:1       | –             |
| Витримування при 60°C протягом 1 години  | 111  | 39  | 150                                | 2,8:1*      | $\chi^2=6,16$ |

Примітка:  $\chi^2_{0,05}(df=1) = 3,84$ .

\* – різниця суттєва при  $p \leq 0,05$ .

Таким чином, у даному випадку, можна говорити, що популяція пилкових зерен, яка є більш стійкою до високих температур, також насичена генами, що відповідають за маркерну ознаку «дихотомічне жилкування».

В останньому досліді, де вивчався вплив прогрітого пилку на генетичну структуру популяції F<sub>2</sub> після її пророщування на осмотику, було проведено маркерний аналіз і серед рослин, які були отримані з насіння, що проросло на розчині ПЕГ 6000 (таблиця 3.16). Маркерний аналіз проводився за обома ознаками.

Таблиця 3.16. Вплив прогрівання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» на розщеплення за маркерними ознаками в поколінні F<sub>2</sub>, яке було отримано з пророслого на розчині ПЕГ 6000 насіння

| Варіант                                  | Рослини F <sub>2</sub> без маркерної ознаки, шт. | Рослини F <sub>2</sub> з маркерною ознакою, шт. | Всього рослин F <sub>2</sub> , шт. | Розщеплення | $\chi^2$       |
|--|--|---|------------------------------------|-------------|----------------|
| Маркерна ознака « <i>virescent</i> »     |  |   |                                    |             |                |
| Контроль (свіжозібраний пилочок)         | 26   | 1   | 27                                 | 26:1        | –              |
| Витримування при 60°C протягом 1 години  | 86   | 10  | 96                                 | 8,6:1*      | $\chi^2=12,13$ |
| Маркерна ознака «дихотомічне жилкування» |  |   |                                    |             |                |
| Контроль (свіжозібраний пилочок)         | 21   | 6   | 27                                 | 3,5:1       | –              |
| Витримування при 60°C протягом 1 години  | 69   | 27  | 96                                 | 2,6:1       | $\chi^2=1,94$  |

Примітка:  $\chi^2_{0,05}(df=1) = 3,84$ .

\* – різниця суттєва при  $p \leq 0,05$ .

Дані, які були представлені у таблиці 3.16, показують, що посухостійка частина популяції F<sub>2</sub>, отриманої з використанням прогрітого пилку, більш насичена рослинами, які несуть маркерну ознаку «*virescent*», ніж посухостійка частина контрольної популяції F<sub>2</sub>. Різниці у розщепленні між контролем та дослідом за маркерною ознакою не спостерігалось. Таким чином, ми можемо констатувати, що прогрівання пилку змінює генетичну структуру посухостійкої частини популяції F<sub>2</sub>, збільшуючи у ній частку рослин, які несуть маркерну ознаку «*virescent*».

Не дивлячись на збільшення кількості рослин з ознакою «дихотомічне жилкування» в популяції F<sub>2</sub>, яка отримана з використанням прогрітого пилку, у

посухостійкій частині цієї популяції кількість таких рослин не відрізняється від їх кількості у посухостійкої частини контрольної популяції  $F_2$ , яка була отримана з використанням свіжозібраного пилку. Це свідчить про те, що рослини з ознакою «дихотомічне жилкування» є менш посухостійкими, оскільки більшість цих рослин зконцентрована у не стійкій до посухи частині популяції.

Збільшення посухостійкості спорофітної популяції  $F_2$ , яка отримана з використанням прогрітого пилку (таблиця 3.13), а також збільшення у посухостійкої частині цієї популяції рослин, що несуть маркерну ознаку «*virescent*» (таблиця 3.16), дозволяє припустити, що рослини, які несуть цю маркерну ознаку, є більш посухостійкі, а отже ця ознака зчеплена з генами, що відповідають за посухостійкість рослин.

*Вплив прогрівання пилку гібридів  $F_1$  на генетичну структуру популяцій  $F_2$  за кількісними ознаками*

Також було вивчено вплив гаметофітного (прогрівання пилку) та спорофітного (прогрівання насіння) доборів, а також їх спільної дії на висоту спорофітних популяцій  $F_2$  соняшнику (таблиці 3.17 та 3.18).

Таблиця 3.17. Зміна висоти рослин популяцій  $F_2$  соняшнику під впливом гаметофітного добору на жаростійкість

| Варіант  | Висота      | Дисперсія |
|--|-------------|-----------|
| $F_2$ « <i>xantha</i> » × «дихотомічне жилкування» |             |           |
| Контроль   | 115,61±4,53 | 574,99    |
| Прогрівання пилку протягом 1 години                | 122,84±1,29 | 272,07    |
| $F_2$ «дихотомічне жилкування» × « <i>xantha</i> » |             |           |
| Контроль   | 125,71±2,15 | 315,70    |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин                 | 125,06±0,73 | 219,06    |

Таблиця 3.18. Зміна висоти рослин популяцій F<sub>2</sub> соняшнику під впливом гаметофітного та спорофітного доборів на жаростійкість, а також їх спільної дії

| Варіант   | Висота      | Дисперсія |
|---|-------------|-----------|
| F <sub>2</sub> « <i>xantha</i> » × «карлик»               |             |           |
| Контроль  | 111,27±2,73 | 305,55    |
| Прогрівання насіння                                       | 111,67±1,90 | 352,24    |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин                        | 112,96±2,05 | 418,89    |
| Прогрівання пилку протягом 3 годин та прогрівання насіння | 114,17±2,83 | 570,17    |

Як видно з представлених у таблицях 3.17 та 3.18 даних, ні прогрівання пилку, ні прогрівання насіння, ні спільна дія цих впливів не змінили середню висоту рослин в жодній з популяцій F<sub>2</sub> порівняно з контролем.

Разом з вивченням зміни середньої висоти рослин в популяціях F<sub>2</sub>, вивчали зміну частки рослин в популяції за класами висоти. Кожен клас становив інтервал в 10 см (рис. 3.2-3.4).

Рисунок 3.2 показує, що прогрівання пилку в цілому зменшило частку рослин в класах висоти від 51-60 до 101-110 см і збільшило відповідно частку рослин в класах висоти від 111-120 см до 151-160 см в комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування». У контролі рослин з висотою 51-110 см було 39,3±9,23%, а рослин з висотою 111-160 – 60,7±9,23%. В популяції рослин F<sub>2</sub>, які були отримані після запилення прогрітим пилком, рослин з висотою 51-110 см було 16,5±2,9% (відмінності від контролю суттєві при  $p = 0,95$ ), в той час як рослин з висотою 111-160 було вже 83,5±2,9% (відмінності суттєві при  $p = 0,95$ ). Це дозволяє стверджувати, що в даній комбінації схрещування ми також можемо спостерігати зміну генетичної структури популяції F<sub>2</sub> за висотою рослин. Прогрівання пилку змінило висоту популяції F<sub>2</sub>, збільшивши частку рослин серед високорослих генотипів.

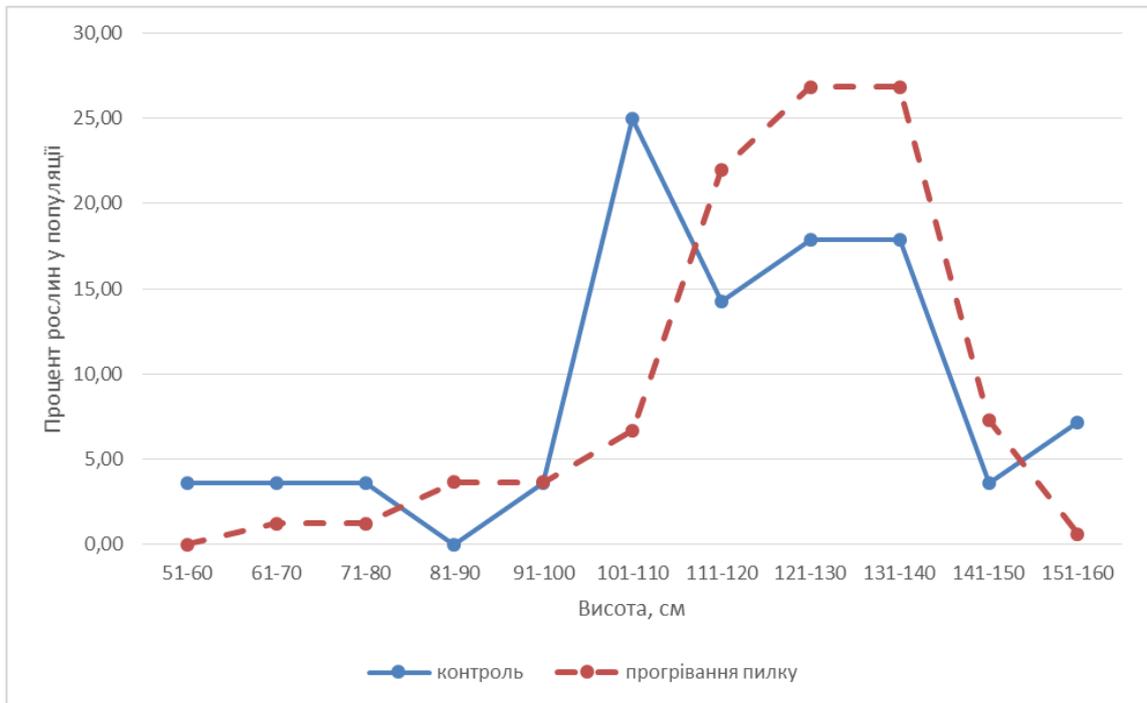


Рисунок 3.2. Вплив гаметофітного добору на співвідношення класів рослин за висотою в популяціях  $F_2$  соняшнику в комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування»

Оскільки лінія «дихотомічне жилкування» є більш високорослою, ніж лінія «*xantha*», можна говорити, що в популяції  $F_2$ , яка отримана після запилення прогрітим пилком, збільшена кількість рослин, які можуть відповідати або батьківській лінії «дихотомічне жилкування», або гібридним генотипам.

З даних, що показані на рисунку 3.3, можна стверджувати, що в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» прогрівання пилку не вплинуло на розподіл рослин за класами висоти. У даній комбінації схрещування пилковий добір не вплинув на генетичну структуру популяції  $F_2$  за висотою рослин.

На рисунку 3.4 видно, що прогрівання пилку протягом 3 годин не змінювало частку рослин в кожному класі висоти в порівнянні з контролем в комбінації схрещування «*xantha*» × «карлик». Прогрівання насіння також не змінювало розподіл рослин за класами висоти у популяції  $F_2$ .

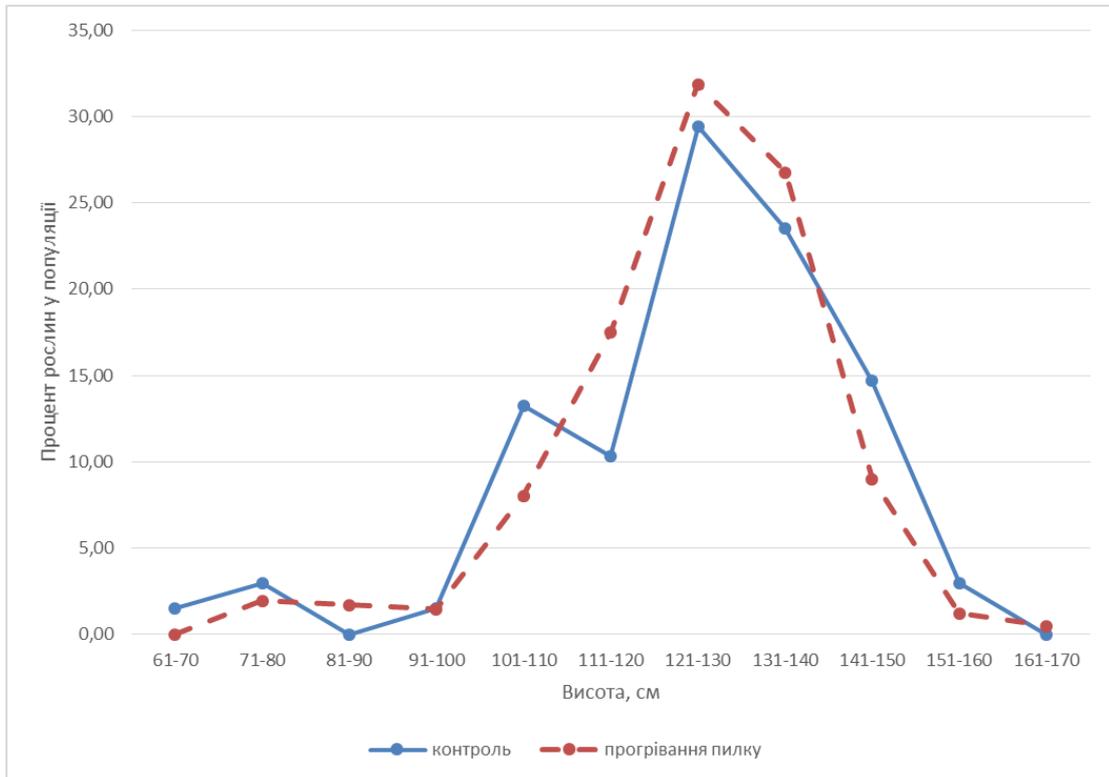


Рисунок 3.3. Вплив гаметофітного добору на співвідношення класів рослин за висотою в популяціях  $F_2$  соняшнику в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*»

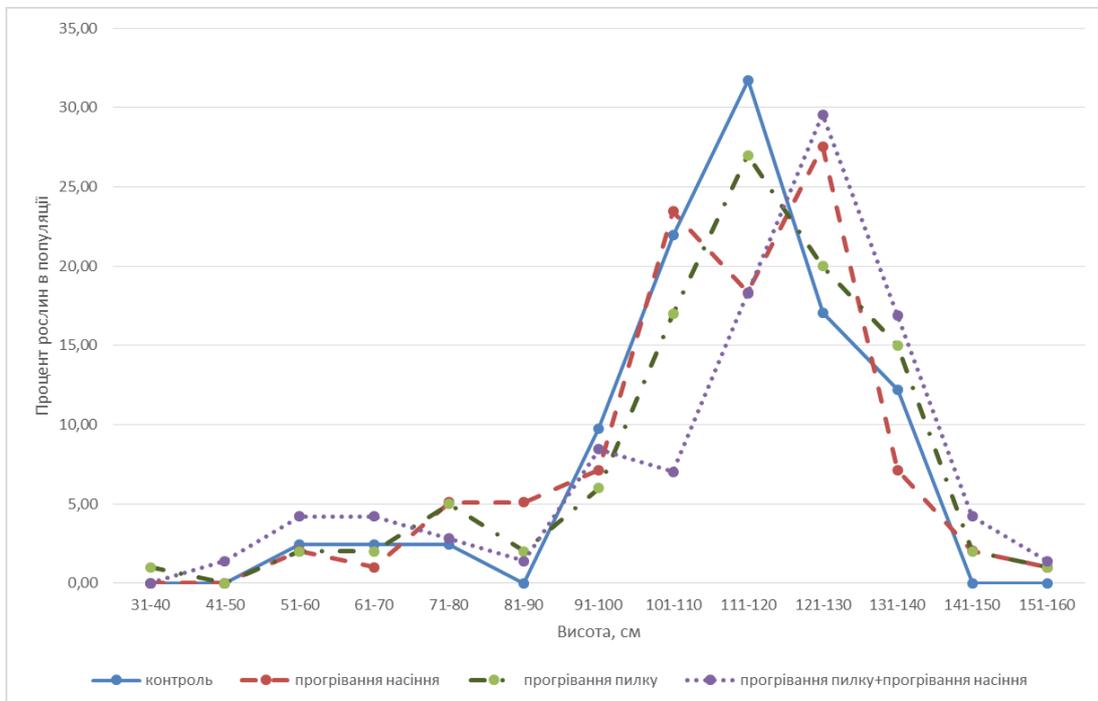


Рисунок 3.4. Вплив гаметофітного та спорофітного доборів, а також їх спільної дії на співвідношення класів рослин за висотою в популяціях  $F_2$  соняшнику в комбінації схрещування «*xantha*» × «карлик»

Прогрівання пилку протягом 3 годин з подальшим прогріванням насіння, отриманого з використанням цього пилку, зменшило частку рослин в класах висоти 91-100 см – 111-120 см. У контролі частка рослин у цих класах висоти складала  $63,4 \pm 7,52\%$ , в той час, як у досліді цей показник становив  $33,8 \pm 5,61\%$  (відмінності суттєві при  $p = 0,99$ ). Збільшення частки рослин спостерігалось в класах висоти 121-130 см – 151-160 см до  $52,1 \pm 5,93\%$  (відмінності суттєві при  $p = 0,95$ ) у досліді, порівняно з контролем, де цей показник становив  $29,3 \pm 7,11\%$ . Висота рослин в контрольній та дослідній популяціях не змінювалась у класах висоти з 31-40 см до 81-90 см. Ці дані дозволяють стверджувати, що, не дивлячись на незмінність середньої висоти популяції, ми можемо спостерігати зміну генетичної структури за висотою рослин під впливом сумарної дії гаметофітного та спорофітного доборів.

Узагальнюючи всі дані, що представлено у розділі, можна стверджувати, що прогрівання пилку гібридів  $F_1$  збільшує жаростійкість, а також посухостійкість та адаптаційні властивості популяції спорофітів  $F_2$ . Такий вплив на пилки змінює генетичну структуру популяції спорофітів  $F_2$  за висотою рослин. Слід зазначити, що гаметофітний добір на жаростійкість майже не змінює структуру популяції  $F_2$  за маркерними ознаками.

Отримані в ході досліджень впливу прогрівання пилку на генетичну структуру популяції спорофітів  $F_2$  за маркерними ознаками, а також вивчення жаростійкості та посухостійкості отриманих популяцій спорофітів  $F_2$ , представлені у публікаціях [142, 143, 144, 145, 146].

## РОЗДІЛ 4. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ

### 4.1. Стійкість вихідного матеріалу до посухи

Посухостійкість ліній визначали за двома показниками, а саме – за відотною довжиною та сухою масою зародкових корінців після пророщування на розчині цукрози. Дані за відотною довжиною зародкових корінців представлені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Відносна довжина зародкових корінців при проростанні на розчині цукрози

| Генотип                | Середня довжина зародкових корінців у контролі, мм | Середня довжина зародкових корінців у досліді, мм | Відносна середня довжина зародкових корінців, % |
|------------------------|--|---|---|
| Дихотомічне жилкування | 145,74±8,28  | 22,18±2,54  | 15,2±5,24                                       |
| <i>Virescent</i>       | 135,63±14,16                                       | 44,64±6,41  | 32,9±8,58                                       |

Примітка: \* – відмінності істотні при 0,05 рівні значущості.

Лінія «дихотомічне жилкування» мала тенденцію до зменшення відносної середньої довжини зародкових корінців після пророщування на розчині цукрози, порівняно з лінією «*virescent*», де відповідний показник був в двічі більшим. Однак, через велику дисперсію ознаки відмінності між лініями не були суттєвими.

Дані за відотною сухою масою зародкових корінців генотипів представлені в таблиці 4.2.

За відотною сухою масою зародкових корінців лінія «*virescent*» мала вищий показник, який становив 44,6±9,08%. В той же час лінія «дихотомічне жилкування» характеризувалася більш ніж вдвічі меншою відотною сухою масою зародкових корінців.

Таблиця 4.2. Відносна суха маса зародкових корінців при проростанні на розчині цукрози

| Генотип                | Середня суха маса зародкових корінців у контролі, г | Середня суха маса зародкових корінців у досліді, г | Відносна середня суха маса зародкових корінців, % |
|------------------------|---|--|---|
| Дихотомічне жилкування | 0,2904  | 0,0600   | 20,7±5,91   |
| <i>Virescent</i>       | 0,1803  | 0,0805   | 44,6±9,08*  |

Примітка: \* – відмінності істотні при 0,05 рівні значущості.

При зіставленні обох показників, на основі яких проводилася оцінка посухостійкості, з урахуванням суттєвості відмінностей, було констатовано, що мутантні лінії відрізняються одна від одної. Мутантна лінія «*virescent*» за відносною сухою масою зародкових корінців є більш посухостійкою, ніж мутант «дихотомічне жилкування».

На підставі даних, що висвітлені вище, можна говорити, що отримання гібриду  $F_1$  «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» є доцільним для дослідження впливу гаметофітного добору під дією осмотика на посухостійкість популяцій спорофітів  $F_2$ .

#### 4.2. Вплив осмотичного стресу на проростання пилку соняшника

Для визначення ефективності дії підвищеної концентрації ПЕГ 6000, що імітує дію посухи, на пилки, було проведено пророщування пилку на штучному середовищі з 40%-вим та 50%-вим вмістом ПЕГ 6000 у ньому. Слід додати, що стандартне штучне середовище для пророщування пилку соняшника містить 30% ПЕГ, а концентрації 40% та 50% ПЕГ відповідають осмотичному стресу, який завдається 10%-вим та 20%-вим розчином ПЕГ. Вплив такого стресу на пилки представлено у таблиці 4.3 на прикладі гібриду  $F_1$  «*virescent*» × «дихотомічне жилкування», батьківські лінії якого були контрастні за посухостійкістю.

Таблиця 4.3. Вплив пророщування пилку гібриду F<sub>1</sub> під впливом осмотика на процент проростання пилкових зерен на штучному середовищі

| Варіант  | Повторність | Кількість проаналізованих пилкових зерен, шт. | Пророслих пилкових зерен, шт. | Процент проростання пилку | Середній процент проростання пилку |
|--|-------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Контроль   | 1           | 487   | 113                           | 23,2±1,91                 | 24,7±1,48                          |
|  | 2           | 363   | 97                            | 26,7±2,32                 |                                    |
| Пророщування пилку на штучному середовищі з 40% ПЕГ 6000 | 1           | 369   | 20                            | 5,4±1,18                  | 5,7±0,87***                        |
|  | 2           | 336   | 20                            | 6,0±1,29                  |                                    |
| Пророщування пилку на штучному середовищі з 50% ПЕГ 6000 | 1           | 333   | 9                             | 2,7±0,89                  | 3,0±0,68***.#                      |
|  | 2           | 303   | 10                            | 3,3±1,03                  |                                    |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю істотні при  $p \leq 0,001$ ;

# – відмінності між дослідними варіантами істотні при  $p \leq 0,05$ .

Як видно з таблиці, обидва режими обробки істотно зменшують процент проростання пилку на штучному середовищі. Пророщування пилку на штучному середовищі з 40% ПЕГ 6000 зменшує процент проростання пилкових зерен більш ніж у 4 рази, а пророщування на 50% ПЕГ 6000 – більше ніж у 8 разів. Пророщування пилку на штучному середовищі з 50% ПЕГ 6000 також істотно більше зменшує процент проростання пилкових зерен, ніж аналогічне пророщування на штучному середовищі з 40% ПЕГ 6000 (рисунок 4.1).

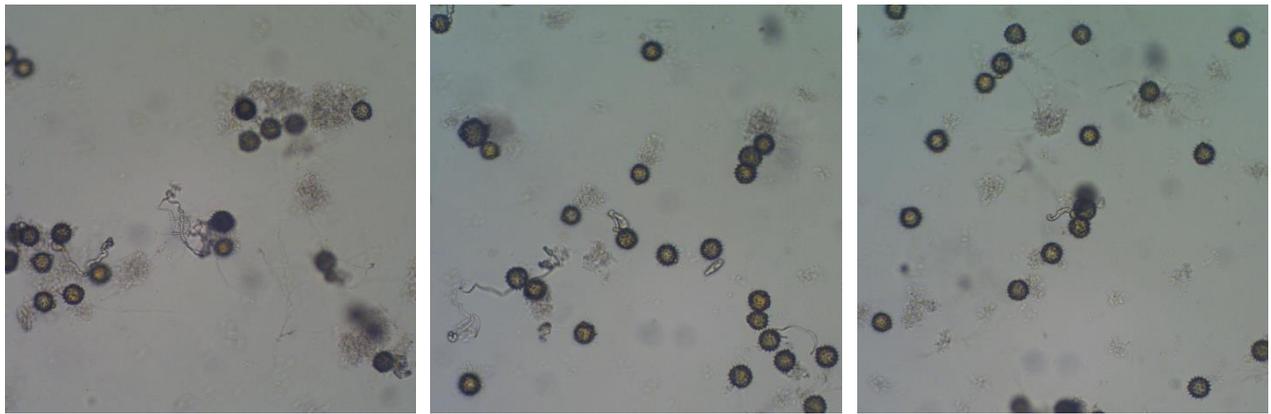


Рисунок 4.1. Процент проростання пилку гібриду  $F_1$  «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» на штучному середовищі з 40%-вим (по центру) та 50%-вим вмістом ПЕГ 6000 (праворуч) у порівнянні з контролем (ліворуч).

Виходячи з цих даних, можна стверджувати, що обидва режими обробки пилку є ефективними та можуть бути використані для проведення гаметофітного добору на посухостійкість, який завдяки імовірній селективній елімінації не стійких до посухи пилкових зерен, може збільшити посухостійкість спорофітних популяцій  $F_2$ .

#### **4.3. Вплив проростання пилку гібридів $F_1$ під впливом осмотика на генетичну структуру популяцій $F_2$ та їх стійкість до посухи**

*Вплив проростання пилку гібридів  $F_1$  в присутності розчину ПЕГ 6000 на посухостійкість популяцій  $F_2$*

Для проведення гаметофітного добору кошики гібридів  $F_1$  соняшника змочували 10%-вим та 20%-вим розчином ПЕГ 6000, а потім запилювали свіжозібраним пилком. Розчин ПЕГ проявляв високу осмотичну активність, поглинаючи вологу з тканин рослини, що було видно за зав'яданням квіток та листків обгортки (рисунок 4.2).

Для визначення впливу проростання пилку в присутності ПЕГ 6000 під час запилення на посухостійкість популяцій спорофітів  $F_2$ , порівнювали процент проростання насіння  $F_2$ , отриманого після гаметофітного добору, з

процентом проростання насіння  $F_2$ , отриманого без гаметофітного добору, на 20% розчині ПЕГ 6000 (таблиця 4.4).



Рисунок 4.2. Добовий вплив змочення 10%-вим розчином ПЕГ 6000 на суцвіття соняшника (ліворуч) у порівнянні з контролем (праворуч)

Таблиця 4.4. Вплив проростання пилку гібриду  $F_1$  соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» в присутності розчину ПЕГ на посухостійкість спорофітної популяції  $F_2$

| Варіант  | Всього насіння $F_2$ , шт. | Проросло насіння $F_2$ , шт. | Процент проростання |
|--|----------------------------|------------------------------|---------------------|
| Контроль   | 156                        | 30                           | 19,2±3,15%          |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 154                        | 106                          | 68,8±3,73%***       |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 148                        | 23                           | 15,5±2,97%          |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю суттєві при  $p = 0,999$ .

Як видно з представлених у таблиці 4.4 даних, у комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» процент проростання насіння на 20% розчині ПЕГ 6000 не відрізнявся у контролі та у досліді, де для отримання насіння  $F_2$  використовували запилення свіжозібраним пилком змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 кошиків. Однак процент проростання насіння на розчині осмотику був значно вищий у популяції  $F_2$ , яка була отримана після запилення свіжозібраним пилком кошиків, змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000. Такі результати можуть свідчити, що проведення гаметофітного добору було ефективним та призвело до збільшення посухостійкості спорофітної популяції  $F_2$ . Проростання пилку на кошику, змоченому 20%-вим розчином ПЕГ 6000, не було ефективним, що можна пояснити, можливо занадто жорстким фоном добору, який втратив, таким чином, свою селективну дію.

*Вплив проростання пилку гібридів  $F_1$  в присутності розчину ПЕГ 6000 на генетичну структуру популяції  $F_2$  за маркерними мутантними ознаками*

Додатково було проведено вивчення зміни генетичної структури популяції  $F_2$  після проведення гаметофітного добору на посухостійкість за маркерними ознаками «*virescent*» та «дихотомічне жилкування» (таблиці 4.5 та 4.6). Зміна розщеплення за цими маркерними ознаками може показати, що гени, які їх детермінують, або впливають на посухостійкість рослин безпосередньо, або зчеплені з генами, які детермінують стійкість рослин до осмотичного стресу та відповідно до посушливих умов зовнішнього середовища.

Результати маркерного аналізу за ознакою «*virescent*», яка характеризується жовтим забарвленням верхівки та добре ідентифікується (рисунок 4.3), у першій повторності показують, що зміна розщеплення відбувається лише у популяції  $F_2$ , яка була отримана після запилення свіжозібраним пилком кошиків, змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000, порівняно з контрольною популяцією рослин  $F_2$ . Однак у другій повторності зміна розщеплення відбувається в обох дослідних популяціях  $F_2$ , які були отримані після запилення свіжозібраним пилком кошиків, змочених як 10%-вим, так і 20%-вим розчином ПЕГ 6000, порівняно з контрольною популяцією

рослин F<sub>2</sub>. В усіх випадках відбувалося значне збільшення частки рослин, що несуть ознаку «*virescent*».

Таблиця 4.5. Вплив проростання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» в присутності розчину ПЕГ 6000 на розщеплення за маркерною ознакою «*virescent*» в поколінні F<sub>2</sub>

| Варіант  | Зелені,<br>шт. | <i>Virescent</i> ,<br>шт. | Всього<br>рослин<br>F <sub>2</sub> , шт. | Розщеп-<br>лення | $\chi^2$       |
|--|----------------|---------------------------|--|------------------|----------------|
| Перша повторність  |                |                           |  |                  |                |
| Контроль   | 111            | 27                        | 138                                      | 4,1:1            | –              |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 103            | 27                        | 130                                      | 3,8:1            | $\chi^2=0,11$  |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 87             | 32                        | 119                                      | 2,7:1*           | $\chi^2=4,00$  |
| Друга повторність  |                |                           |  |                  |                |
| Контроль   | 87             | 15                        | 102                                      | 5,8:1            | –              |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 113            | 41                        | 154                                      | 2,8:1*           | $\chi^2=17,44$ |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 63             | 20                        | 83                                       | 3,2:1*           | $\chi^2=5,84$  |

Примітка:  $\chi^2_{0,05}(df=1) = 3,84$ .

\* – різниця суттєва при  $p \leq 0,05$ .

Це, може свідчити про те, що такий гаметофітний добір сприяв виживанню гамет, що несуть цю маркерну ознаку. Таким чином, ми можемо

констатувати факт зміни генетичної структури популяції  $F_2$  під впливом гаметофітного добору на посухостійкість.



Рисунок 4.3. Розщеплення за маркерною ознакою «*virescent*», яка характеризується жовтим забарвленням верхівки, у популяції  $F_2$  «*virescent*» × «дихотомічне жилкування».

Представлені у таблиці 4.6 дані показують, що за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» зміни у розщепленні рослин в популяції  $F_2$  у досліді порівняно з контролем не спостерігалось. Тобто, можна припустити, що гени, які контролюють цю маркерну ознаку, не зчеплені з генами, які детермінують посухостійкість.

Також було вивчено вплив пророщування пилку на змочених осмотиком приймочках на зміну генетичної структури тієї частини популяції  $F_2$ , яка була отримана з використанням насіння, що проросло на розчині ПЕГ 6000, тобто у посухостійкої частини популяції  $F_2$  (таблиці 4.7).

Таблиця 4.6. Вплив проростання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» в присутності розчину ПЕГ 6000 на розщеплення за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» в поколінні F<sub>2</sub>

| Обробка пилку  | Сітчасте жилкування, шт. | Дихотомічне жилкування, шт. | Всього рослин F <sub>2</sub> , шт. | Розщеплення | $\chi^2$      |
|--|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------|---------------|
| Перша повторність  |                          |                             |                                    |             |               |
| Контроль   | 112                      | 25                          | 137                                | 4,5:1       | –             |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 99                       | 31                          | 130                                | 3,2:1       | $\chi^2=2,80$ |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 90                       | 27                          | 117                                | 3,3:1       | $\chi^2=1,88$ |
| Друга повторність  |                          |                             |                                    |             |               |
| Контроль   | 74                       | 28                          | 102                                | 2,6:1       | –             |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 114                      | 40                          | 154                                | 2,9:1       | $\chi^2=0,25$ |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 66                       | 17                          | 83                                 | 3,9:1       | $\chi^2=2,20$ |

Примітка:  $\chi^2_{0,05}(df=1) = 3,84$ .

\* – різниця суттєва при  $p \leq 0,05$ .

Таблиця 4.7. Вплив проростання пилку гібриду F<sub>1</sub> соняшника комбінації схрещування «*virescent*» × «дихотомічне жилкування» в присутності розчину ПЕГ 6000 на розщеплення за маркерними ознаками в поколінні F<sub>2</sub>, яке було отримано з пророслого на розчині ПЕГ 6000 насіння

| Варіант  | Рослини F <sub>2</sub> без маркерної ознаки, шт. | Рослини F <sub>2</sub> з маркерною ознакою, шт. | Всього рослин F <sub>2</sub> , шт. | Розщеплення | $\chi^2$       |
|--|--|---|------------------------------------|-------------|----------------|
| Маркерна ознака « <i>virescent</i> »                             |  |   |                                    |             |                |
| Контроль   | 26   | 1   | 27                                 | 26:1        | –              |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 85   | 16  | 101                                | 5,3:1*      | $\chi^2=41,72$ |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 14   | 7   | 21                                 | 2:1*        | $\chi^2=51,69$ |
| Маркерна ознака «дихотомічне жилкування»                         |  |   |                                    |             |                |
| Контроль   | 21   | 6   | 27                                 | 3,5:1       | –              |
| Пилок проростав на змочених 10%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 76   | 25  | 101                                | 3:1         | $\chi^2=0,37$  |
| Пилок проростав на змочених 20%-вим розчином ПЕГ 6000 приймочках | 15   | 6   | 21                                 | 2,5:1       | $\chi^2=0,49$  |

Примітка:  $\chi^2_{0,05}(df=1) = 3,84$ .

\* – різниця суттєва при  $p \leq 0,05$ .

Результати маркерного аналізу, які представлені у таблиці 4.7, показують, що різниці у розщепленні між контролем та дослідними варіантами за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» не спостерігається. Проте, проростання пилку на приймочках, змочених як 10%-вим, так і 20%-вим розчином ПЕГ 6000, змінило генетичну структуру посухостійкої частини популяції  $F_2$ . В обох варіантах значно збільшено кількість рослин, що несуть маркерну ознаку «*virescent*». Необхідно відзначити, що у посухостійкої частини контрольної популяції  $F_2$  рослини з маркерною ознакою «*virescent*» майже не виявлялися (26:1), тоді як у посухостійких частинах дослідних популяцій  $F_2$  (обробка 10%-вим та 20%-вим розчином ПЕГ 6000) їх кількість збільшувалась у більш ніж 5 та 10 разів відповідно. Таким чином, ми можемо стверджувати, що збільшення кількості рослин з маркерною ознакою «*virescent*» відбувалось в основному за рахунок збільшення кількості таких рослин у посухостійкої частини дослідної популяції  $F_2$ .

Підводячи підсумок розділу, слід сказати, що запилення свіжозібраним пилком приймочок, змочених осмотично активною речовиною (розчином ПЕГ 6000), може збільшувати посухостійкість популяцій спорофітів  $F_2$  та змінювати їх генетичну структуру. Також слід зазначити, що одночасне збільшення після дії гаметофітного добору посухостійкості популяції  $F_2$ , збільшення у загалом у популяції  $F_2$  кількості рослин, що несуть маркерну ознаку «*virescent*», разом зі збільшенням таких рослин у посухостійкій частині популяції  $F_2$ , свідчить про те, що гени, які детермінують ознаку «*virescent*», або безпосередньо впливають на посухостійкість, або зчеплені з генами, які відповідають за посухостійкість пилку та рослин. В той же час відсутність змін у розщепленні за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» вказує на те, що гени, які детермінують цю ознаку, не пов'язані з генами, що впливають на посухостійкість соняшника.

Результати, представлені в даному розділі, відображені у публікаціях [147, 148].

## РОЗДІЛ 5. ГАМЕТОФІТНИЙ ДОБІР НА ХОЛОДОСТІЙКІСТЬ

### 5.1. Стійкість вихідного матеріалу до низьких температур

Порівнюючи вихідний матеріал за холодостійкістю використовували два показники. Першим з них був процент проростання насіння, другим – довжина зародкових корінців.

Для порівняння генотипів мутантних ліній, що використовувалися як вихідний матеріал, за процентом проростання насіння, його пророщували протягом 5 діб при температурі  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , що являлося контролем, та протягом 13 діб при температурі  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  (дослідний варіант). Пророщування у дослідному варіанті займало більше часу, оскільки проростання насіння при зниженій температурі було значно пригнічено. Після підрахунку проценту проростання у контролі та досліді визначали відносний процент проростання насіння, тобто відношення проценту проростання насіння після пророщування при низькій температурі до проценту проростання насіння після пророщування при оптимальній температурі, що характеризує холодостійкість вихідного матеріалу (таблиця 5.1).

Таблиця 5.1. Відносний процент проростання насіння при зниженій температурі у різних мутантних генотипів соняшника

| Генотип                | Процент проростання у контролі | Процент проростання у досліді | Відносний процент проростання |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Дихотомічне жилкування | 95,0                           | 14,0                          | $14,7\pm 2,51$                |
| <i>Xantha</i>          | 85,0                           | 3,0                           | $3,5\pm 1,30$                 |
| Карлик                 | 54,5                           | 7,5                           | $13,8\pm 2,44$                |

Представлені у таблиці 5.1 дані показують, що найменшу холодостійкість має генотип «*xantha*», у якого значно пригнічено проростання насіння у досліді порівняно з контролем, а генотипи «дихотомічне жилкування» та «карлик» приблизно однакові за цим показником. У цих ліній проростання насіння у

досліді також значно пригнічено, проте процент проростання у них в чотири рази перевищує відповідний показник у лінії «*xantha*». Для виявлення істотності різниці між представленими зразками за процентом проростання насіння було обчислено критерій Стьюдента для кожної пари генотипів (таблиця 5.2).

Таблиця 5.2. Відмінності між генотипами за відносним процентом проростання насіння (критерій Стьюдента)

| Генотип                | Дихотомічне жилкування | <i>Xantha</i> | Карлик  |
|------------------------|------------------------|---------------|---------|
| Дихотомічне жилкування | –                      | 3,96***       | 0,26    |
| <i>Xantha</i>          | 3,96***                | –             | 3,73*** |
| Карлик                 | 0,26                   | 3,73***       | –       |

Примітка: \*\*\* – відмінності суттєві при  $p = 0,999$ .

Таблиця 5.2 показує, що у парі, де порівнюються генотипи «дихотомічне жилкування» та «*xantha*», між ними спостерігається істотна різниця за холодостійкістю. Так само істотну різницю можна знайти і між генотипами «карлик» та «*xantha*». Однак між генотипами «дихотомічне жилкування» та «карлик» ми не спостерігаємо істотної різниці за відносним процентом проростання насіння.

Порівняння вихідних ліній за довжиною зародкових корінців проводили аналогічним чином. Для початку вимірювали довжину зародкових корінців у контролі, де насіння для отримання проростків пророщували протягом 5 діб при температурі  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , та у досліді, де пророщування насіння при температурі  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  проводили протягом 28 діб. Така довга експозиція при пророщуванні на холоді пояснюється тим, що тільки після проходження цього часу у всіх генотипів сформувалися достатньо розвинені для вимірювань проростки. Потім порівнювали середню довжину зародкових корінців у досліді та контролі, визначаючи відношення даного показника у досліді до контрольного варіанту.

Таким чином визначали відносну середню довжину зародкових корінців, яка характеризує холодостійкість генотипів, що вивчаються (таблиця 5.3).

Таблиця 5.3. Відносна довжина зародкових корінців при зниженій температурі у різних мутантних генотипів соняшника

| Генотип                | Середня довжина зародкових корінців у контролі, мм | Середня довжина зародкових корінців у досліді, мм | Відносна середня довжина зародкових корінців, % |
|------------------------|--|---|---|
| Дихотомічне жилкування | 4,88±0,38  | 14,50±0,54  | 297,1±19,53                                     |
| <i>Xantha</i>          | 12,55±0,86   | 4,87±0,44   | 38,8±5,55                                       |
| Карлик                 | 8,10±0,57  | 6,49±0,35   | 80,1±4,35                                       |

Виходячи з табличних даних, можна говорити, що найменшою холодостійкістю за показником довжини зародкових корінців характеризується лінія «*xantha*», адже у неї довжина зародкових корінців у досліді складає всього 38,8% від цього показнику у контролі. Вплив пророщування при пониженій температурі не був настільки суттєвим у лінії «карлик», що показує довжина зародкових корінців у досліді, яка складала 80,1% від даного показнику у контролі. Найменший вплив стрес мав на лінію «дихотомічне жилкування», де спостерігається навіть збільшення довжини зародкових корінців у досліді порівняно з контролем. Це можна пояснити тим, що визначення довжини зародкових корінців у досліді проводилося, коли стало можливим визначення довжини зародкових корінців у лінії «*xantha*», яка формувала зародкові корінці при зниженій температурі довше за всі генотипи. Для визначення істотності різниці між вихідними лініями за довжиною зародкових корінців було обчислено критерій Стьюдента для кожної пари генотипів (таблиця 5.4).

Таблиця 5.4. Відмінності між генотипами за відносною довжиною зародкових корінців (критерій Стьюдента)

| Генотип                | Дихотомічне жилкування | <i>Xantha</i> | Карлик   |
|------------------------|------------------------|---------------|----------|
| Дихотомічне жилкування | –                      | 12,72***      | 10,85*** |
| <i>Xantha</i>          | 12,72***               | –             | 5,86***  |
| Карлик                 | 10,85***               | 5,86***       | –        |

Примітка: \*\*\* – відмінності суттєві при  $p = 0,999$ .

Представлені у таблиці 5.4 дані показують, що всі генотипи істотно відрізняються один від одного за відносною довжиною зародкових корінців.

Узагальнюючи дані, представлені у таблицях 5.1-5.4, можна сказати, що за обома показниками ми спостерігаємо однаковий розподіл вихідних ліній за холодостійкістю. Найменшою холодостійкістю за обома показниками характеризується генотип «*xantha*». Мутант «карлик» за відносним процентом проростання насіння має однакову холодостійкість з мутантом «дихотомічне жилкування», однак поступається останньому за відносною довжиною зародкових корінців. Виходячи з вищесказаного, найбільшою холодостійкістю характеризується зразок «дихотомічне жилкування».

Отже для проведення дослідів з гаметофітного добору на холодостійкість були отримані гібриди  $F_1$  наступних комбінацій схрещування — «дихотомічне жилкування» × «*xantha*», «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» та «*xantha*» × «карлик». Батьківські компоненти цих гібридів були контрастними за холодостійкістю на рівні спорофіту.

## **5.2. Вплив витримування пилку соняшника при низькій температурі на його проростання на штучному середовищі**

Для визначення ефективності впливу низьких температур на пилки, його пророщували на штучному середовищі після витримування при температурі  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 7 діб. Реакція пилку на витримування при низькій температурі

наведена у таблиці 5.5 на прикладі пилку гібриду F<sub>1</sub> «дихотомічне жилкування» × «*xantha*», який мав контрастні за холодостійкістю батьківські лінії, а отже популяція пилку цього гібриду була гетерогенною за цим показником.

Таблиця 5.5. Вплив витримування пилку гібриду F<sub>1</sub> при низьких температурах на процент проростання пилкових зерен на штучному середовищі.

| Варіант  | Повторність | Кількість проаналізованих пилкових зерен, шт. | Пророслих пилкових зерен, шт. | Процент проростання пилку | Середній процент проростання пилку |
|----------|-------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Контроль | 1           | 414   | 102                           | 24,6±2,12                 | 26,3±1,59                          |
|          | 2           | 353   | 100                           | 28,3±2,40                 |                                    |
| Дослід   | 1           | 304   | 48                            | 15,8±2,09                 | 13,2±1,29***                       |
|          | 2           | 380   | 42                            | 11,1±1,61                 |                                    |

Примітка: \*\*\* – відмінності від контролю суттєві при  $p = 0,999$ .

Як видно з представлених у таблиці даних, витримування пилку при низьких температурах знижувало процент проростання на штучному середовищі приблизно в два рази (рисунок 5.1).

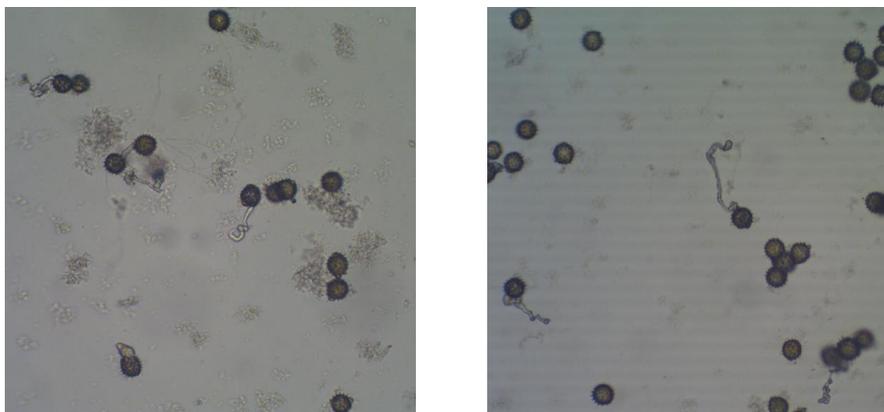


Рисунок 5.1. Життєздатність пилку гібриду F<sub>1</sub> «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» після його витримування при пониженій температурі протягом 8 діб (праворуч) у порівнянні з контролем (ліворуч).

Такі результати дозволяють стверджувати, що параметри обробки пилку є достатніми для проведення добору, тобто такий вплив може мати істотну селективну дію на пилкові зерна та елімінувати недостатньо холодостійкі пилкові зерна з гетерогенної популяції. Отже в подальшому можлива реалізація значно більшої кількості холодостійких генотипів в популяціях рослин, отриманих після запилення таким пилком.

### **5.3. Вплив витримування пилку гібридів $F_1$ при низьких температурах на генетичну структуру популяцій $F_2$ та їх стійкість до холоду**

*Вплив витримування пилку гібридів  $F_1$  при низьких температурах на холодостійкість популяцій  $F_2$*

Для визначення впливу гаметофітного добору на холодостійкість популяцій  $F_2$ , що розщеплюються, порівнювали відсоток проростання насіння, отриманого з використанням витриманого при зниженій температурі пилку, і відсоток проростання насіння, отриманого після запилення рослин свіжозібраним пилком, в умовах зниженої температури в холодильнику (таблиця 5.6).

В результаті пророщування при зниженій температурі насіння  $F_2$ , отриманого після запилення свіжозібраним пилком, в комбінації схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» з 365 насінин проросло 269, що склало 73,7%. У дослідному варіанті, при використанні в запиленні пилку, що зберігався на холоді протягом 7 діб, проросло 364 насінини з 415, тобто 87,7%, що значимо перевищувало контрольне значення. У зворотній комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» спостерігалася аналогічна закономірність. Якщо у контролі з 543 насінин проросло 114, то в досліді - з 276 насінин проросло 160, що становить 21,0% і 58,0% відповідно. Різниця між дослідом і контролем в даному випадку була більш істотна, ніж у попередній комбінації схрещування. Однак в комбінації схрещування «*xantha*» × «карлик» істотної різниці між дослідом і контролем не спостерігалось.

Таблиця 5.6. Вплив зберігання пилку гібридів  $F_1$  при зниженій температурі на проростання насіння  $F_2$  соняшнику в умовах низьких температур

| Обробка пилку                          | Насіння $F_2$ |          | Процент проростання |
|--|---------------|----------|---------------------|
|  | всього        | проросло |                     |
| <i>Дихотомічне жилкування × xantha</i> |               |          |                     |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 365           | 269      | 73,7±2,30           |
| Витримування пилку 7 діб при 3±1°C     | 415           | 364      | 87,7±1,61***        |
| <i>Xantha × дихотомічне жилкування</i> |               |          |                     |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 543           | 114      | 21,0±1,75           |
| Витримування пилку 7 діб при 3±1°C     | 276           | 160      | 58,0±2,97***        |
| <i>Xantha × карлик</i>                 |               |          |                     |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 471           | 189      | 40,1±2,26           |
| Витримування пилку 7 діб при 3±1°C     | 138           | 46       | 33,3±4,01           |

Примітка: \*\*\* – відмінності істотні при 0,001 рівні значущості.

Таким чином, проведення гаметофітного добору було результативним в декількох комбінаціях схрещувань і призвело до збільшення холодостійкості популяцій спорофітів  $F_2$ , що розщеплюються.

*Вплив витримування пилку гібридів  $F_1$  при низьких температурах на генетичну структуру популяцій  $F_2$  за маркерними мутантними ознаками*

Доказом генетичної активності гамет може слугувати зміна генетичної структури популяції  $F_2$  після температурного впливу на мікрогаметофіти гібридів  $F_1$ . Зміна співвідношення рослин за маркерними генами в результаті впливу на гетерогенну популяцію пилку може бути обумовлена тим, що ці гени або самостійно детермінують холодостійкість гаметофіту, або вони зчеплені з геном або генами, що детермінують стійкість до низьких температур.

Витримування пилку гібридів  $F_1$  при зниженій температурі також вплинуло на генетичну структуру популяцій  $F_2$ , змінивши розщеплення за

маркерними ознаками «дихотомічне жилкування» та «карлик» (таблиці 5.7, 5.8, 5.9).

Таблиця 5.7. Вплив зберігання пилку гібридів F<sub>1</sub> при зниженій температурі на розщеплення за маркерними ознаками «дихотомічне жилкування» та «карлик» в популяціях F<sub>2</sub> соняшнику

| Час витримування пилку                 | Фенотип F <sub>2</sub> |                                    | Розщеплення | $\chi^2$ |
|--|------------------------|------------------------------------|-------------|----------|
|  | нормальні рослини      | рослини, що несуть маркерну ознаку |             |          |
| <i>Дихотомічне жилкування × xantha</i> |                        |                                    |             |          |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 179                    | 50                                 | 3,6:1       | 20,6     |
| 7 діб                                  | 244                    | 113                                | 2,2:1***    |          |
| <i>Xantha × дихотомічне жилкування</i> |                        |                                    |             |          |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 167                    | 53                                 | 3,2:1       | 0,9      |
| 7 діб                                  | 155                    | 41                                 | 3,8:1       |          |
| <i>Xantha × карлик</i>                 |                        |                                    |             |          |
| Свіжозібраний пилок (контроль)         | 176                    | 58                                 | 3:1         | 4,0      |
| 7 діб                                  | 39                     | 22                                 | 1,8:1*      |          |

$\chi^2_{0.05}(df=1) = 3,84$ . \*, \*\*\* – відмінності істотні при 0,05 та 0,001 рівнях значущості, відповідно.

Порівнюючи розщеплення в F<sub>2</sub> у рослин, отриманих з використанням гаметофітного добору, і у рослин, отриманих після запилення свіжозібраним

пилком, можна спостерігати зміну розщеплення в дослідних варіантах порівняно з контролем в комбінаціях схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» та «*xantha*» × «карлик» (таблиця 5.7). Рослини, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування», мають характерний тип жилкування, який легко ідентифікується в популяції рослин (рисунок 5.2), а рослини, що мають ознаку «карликовість», значно менші за ростом, ніж інші рослини відповідної популяції. В обох випадках ми бачимо збільшення частки рослин, що несуть маркерну ознаку. Таким чином, ми можемо констатувати факт зміни генетичної структури популяції  $F_2$  під впливом витримування пилку при зниженій температурі. Дана дія на пилки сприяє виживанню гамет, що несуть представлені маркерні ознаки. Однак в комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» зміни генетичної структури популяції  $F_2$  не спостерігалося.



Рисунок 5.2. Рослини, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування», (праворуч) у порівнянні з рослинами, які мають звичайне сітчасте жилкування (ліворуч), у популяції  $F_2$  «дихотомічне жилкування» × «*xantha*»

Таблиця 5.8. Генетична структура популяцій F<sub>2</sub>, складених з пророслого при зниженій температурі насіння

| Час витримування<br>пилку              | Фенотип F <sub>2</sub> |   | Розщеплення | $\chi^2$ |
|--|------------------------|---|-------------|----------|
|  | нормальні<br>рослини   | рослини, що<br>несуть<br>маркерну<br>ознаку |             |          |
| <i>Дихотомічне жилкування × xantha</i> |                        |   |             |          |
| Свіжозібраний пилоч<br>(контроль)      | 161                    | 41  | 3,9:1       | 27,0     |
| 7 діб                                  | 232                    | 108   | 2,1:1***    |          |
| <i>Xantha × дихотомічне жилкування</i> |                        |   |             |          |
| Свіжозібраний пилоч<br>(контроль)      | 62                     | 24  | 2,6:1       | 0,9      |
| 7 діб                                  | 112                    | 36  | 3,1:1       |          |
| <i>Xantha × карлик</i>                 |                        |   |             |          |
| Свіжозібраний пилоч<br>(контроль)      | 125                    | 32  | 3,9:1       | 4,0      |
| 7 діб                                  | 26                     | 13  | 2:1*        |          |

$\chi^2_{0.05}(df=1) = 3,84$ . \*, \*\*\*– відмінності істотні при 0,05 та 0,001 рівнях значущості, відповідно.

Дані, представлені в таблиці 5.8, показують порівняння популяцій F<sub>2</sub>, що складаються лише з пророслого при зниженій температурі насіння, тобто в найбільш холодостійкій частини популяції. Ці дані повторюють результат попереднього порівняння, де в комбінаціях схрещування «дихотомічне жилкування» × «*xantha*» та «*xantha*» × «карлик» в дослідних популяціях збільшилася частка рослин, що несуть відповідні маркерні ознаки.

Таблиця 5.9. Розщеплення фенотипів в контрольних і дослідних популяціях F<sub>2</sub>, що складаються з пророслого і не пророслого при зниженій температурі насіння

| Час витримування пилку                 | Насіння F <sub>2</sub> після пророщування при пониженій температурі | Фенотип F <sub>2</sub> |                                    | Розщеплення | χ <sup>2</sup> |
|--|---|------------------------|------------------------------------|-------------|----------------|
|  |   | нормальні рослини      | рослини, що несуть маркерну ознаку |             |                |
| <i>Дихотомічне жилкування × xantha</i> |   |                        |                                    |             |                |
| Свіжозібраний пилоч (контроль)         | проросле  | 161                    | 41                                 | 3,9:1       | 2,8            |
|  | не проросле   | 18                     | 9                                  | 2:1         |                |
| 7 діб                                  | проросле  | 232                    | 108                                | 2,1:1       | 0,1            |
|  | не проросле   | 12                     | 5                                  | 2,4:1       |                |
| <i>Xantha × дихотомічне жилкування</i> |   |                        |                                    |             |                |
| Свіжозібраний пилоч (контроль)         | проросле  | 62                     | 24                                 | 2,6:1       | 2,5            |
|  | не проросле   | 105                    | 29                                 | 3,6:1       |                |
| 7 діб                                  | проросле  | 112                    | 36                                 | 3,1:1       | 5,1            |
|  | не проросле   | 43                     | 5                                  | 8,6:1*      |                |
| <i>Xantha × карлик</i>                 |   |                        |                                    |             |                |
| Свіжозібраний пилоч (контроль)         | проросле  | 125                    | 32                                 | 3,9:1       | 8,5            |
|  | не проросле   | 51                     | 26                                 | 2:1**       |                |
| 7 діб                                  | проросле  | 26                     | 13                                 | 2:1         | 0,6            |
|  | не проросле   | 13                     | 9                                  | 1,4:1       |                |

χ<sup>2</sup><sub>0.05(df=1)</sub> = 3,84. \*, \*\* – відмінності істотні при 0,05 і 0,001 рівнях значущості, відповідно.

Таблиця 5.9 показує порівняння генетичної структури популяцій  $F_2$ , що склалися з пророслого при низьких температурах насіння, та популяцій  $F_2$ , що склалися з непророслого при низьких температурах насіння, як у контролі, так і у досліді. Це дозволить оцінити вплив обробки пилку на зміну в розщепленнях між холодостійкою та не стійкою частиною популяції. Виникнення таких змін можна використати для порівняння контрольних та експериментальних популяцій  $F_2$ .

В комбінації схрещування «*xantha*» × «дихотомічне жилкування» різниця в розщепленні між популяцією  $F_2$ , що складається з пророслого насіння і популяцією  $F_2$ , що складається з не пророслого насіння, не спостерігалася у контролі. Проте в експериментальній популяції  $F_2$  така різниця була очевидна. Тобто, зберігання при низькій температурі гетерогенної популяції пилку гібриду  $F_1$  збільшило кількість рослин з маркерною ознакою «дихотомічне жилкування» в популяції  $F_2$ , що складається з пророслого при низьких температурних насіння, в порівнянні з популяцією  $F_2$ , що складається з не пророслого при низьких температурах насіння. Це означає, що витримування пилку при низьких температурах збільшило в популяції  $F_2$  частку холодостійких генотипів, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування». Незважаючи на те, що ефект від обробки пилку на генетичну структуру популяції  $F_2$  не спостерігався виходячи з даних, що представлені в таблицях 5.7 і 5.8, такий ефект був виявлений в даному порівнянні.

Аналогічна ситуація селективної елімінації гамет після витримування пилку при низьких температурах спостерігається у комбінації схрещування «*xantha*» × «карлик». Різниця в розщепленнях між популяцією  $F_2$ , що складається з пророслого при низьких температурі насіння, і популяцією  $F_2$ , що складається з не пророслого при низьких температурних насіння, була виявлена в контролі. Спостерігалася збільшення кількості рослин типу «карлик» серед насіння, яке не проросло при низьких температурах. Однак, жодної різниці у розщепленні не виявилось в експериментальній популяції. Таким чином, обробка пилку, порівняно з контролем, збільшила кількість рослин з маркерною ознакою «карликовість» в популяції  $F_2$ , що складається з пророслого при

низькій температурі насіння. Дані розщеплень для обох комбінацій схрещування показують зміну в структурі популяцій  $F_2$  після витримування пилку гібридів  $F_1$  при низьких температурах.

Узагальнюючи дані, представлені в таблицях 5.7-5.9, можна зробити висновок, що витримування пилку при низьких температурах селективно впливає на чоловічий гаметофіт гібридів  $F_1$ , що змінює генетичну структуру популяцій  $F_2$ . Цей вибірковий вплив призвів до збільшення у популяціях  $F_2$  кількості генотипів з маркерними ознаками «дихотомічне жилкування» і «карликовості».

Той факт, що в результаті проведення гаметофітного добору збільшується холодостійкість спорофітних популяцій  $F_2$  і одночасно в них збільшується кількість рослин, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування», дозволяє констатувати, що ген, який детермінує ознаку «дихотомічне жилкування», хоча б частково зчеплений з локусами, що відповідають за холодостійкість у соняшнику.

Результати, представлені у даному розділі, висвітлені у публікаціях [149, 150].

## РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

В результаті роботи, що проведена у 2011-2015 роках, було вивчено вплив гаметофітного добору у гібридів  $F_1$  на жаростійкість, посухостійкість та холодостійкість популяцій  $F_2$  соняшника. Також встановлювався вплив гаметофітного добору на зміну генетичної структури популяції  $F_2$  за морфологічними маркерними ознаками «карлик», «дихотомічне жилкування» та «*virescent*». Разом з тим, було вивчено вплив прогрівання пилку гібридів  $F_1$  на зміну генетичної структури популяції  $F_2$  за висотою рослин.

Прогрівання пилку у наших дослідженнях проводили у сухоповітряному термостаті, а насіння покоління  $F_2$  оцінювали не тільки на жаростійкість, але і на посухостійкість. Це обумовлено тим, що у сухоповітряному термостаті крім підвищеної температури на пилки також водночас впливає низька вологість повітря.

Однак, була також поставлена задача відокремити дію на пилки посушливих умов від дії високих температур. Для цього була використана методика, яка була запропонована Patil та інші [18]. У своїх дослідженнях авторами було використано ПЕГ 6000, який виступає осмотично активною речовиною. Наносячи перед запиленням на квітки рослин сорго цей осмотик, вони імітували, таким чином, дію посушливих умов зовнішнього середовища.

Для адаптації даної методики до соняшника культурного було проведено ряд експериментів, які включали пророщування пилку на штучному середовищі з підвищеним вмістом ПЕГ 6000. Значне зменшення проценту проростання пилку *in vitro* разом зі збереженням його часткової життєздатності при вмісті 40% та 50% ПЕГ 6000 у штучному середовищі для пророщування пилку у порівнянні з показником проростання пилку у контролі, де вміст ПЕГ 6000 у штучному середовищі складав 30% (стандартне штучне середовище), дозволило зробити висновок, що обробка *in vivo* суцвіття соняшника 10%-вим та 20%-вим розчином ПЕГ 6000 може слугувати ефективним селективним

бар'єром для пилку. Таким чином, дію осмотичного стресу на пилки, що імітує посуху, було відокремлено від дії високих температур.

Як видно з результатів нашої роботи, прогрівання пилку збільшує не тільки жаростійкість, але і посухостійкість та адаптаційні властивості популяцій  $F_2$ . Вище вже було зазначено, що у сухоповітряному термостаті крім підвищеної температури на пилки може також впливати низька вологість повітря і тим самим слугувати селективним фактором. Саме тому в результаті прогрівання пилку ми можемо спостерігати не тільки підвищення жаростійкості, але і посухостійкості.

Адаптаційні властивості визначаються схожістю рослин та їх стійкістю у польових умовах до всього комплексу факторів, що на них діють. Оскільки в Запорізькому регіоні, де проводились польові дослідження, під час вегетації соняшника основними лімітуючими факторами були підвищена температура та посуха, стійкість до сукупності цих факторів популяцій  $F_2$ , що були отримані з використанням гаметофітного добору, в основному і підвищує виживання більшої кількості рослин у цих популяціях у польових умовах порівняно з контролем, у якому популяції  $F_2$  були отримані з використанням свіжозібраного пилку. Саме це визначає збільшення адаптаційних властивостей популяцій рослин. Підвищення посухостійкості популяцій рослин після прогрівання пилку спостерігалось також у рицини та льону олійного [14, 113].

Слід зазначити, що на соняшнику роботи з прогрівання пилку гібридів  $F_1$  та дії такого пилку на зміну структури популяції  $F_2$  проводились раніше, але в них не вивчали зміну жаростійкості цієї популяції. Саме в цих роботах [111] встановлено, що ефективною температурою для обробки пилку соняшника є  $60^{\circ}\text{C}$ . Прогрівання пилку гібридів  $F_1$  при менших температурах не виявляло зміни структури популяцій  $F_2$ , що були отримані з використанням цього пилку, за окремими кількісними ознаками порівняно з контролем, популяції  $F_2$  у якому були отримані з використанням свіжозібраного пилку. Разом з тим, слід зазначити, що така температура є досить високою для інших культур, що вказує на високу стійкість пилку соняшника до високих температур. У кукурудзи, наприклад, дія підвищеної температури на пилки виявляється вже при дії  $35^{\circ}\text{C}$

протягом 20 хвилин [13]. У хлопку також дія підвищеної температури на пилок виявлялася вже при 35°C [67].

При проведенні нашої роботи було виявлено підвищення холодостійкості популяції  $F_2$  після дії гаметофітного добору, а також збільшення у ній кількості рослин, що несуть маркерну ознаку «дихотомічне жилкування». Рослин з дихотомічним жилкуванням також було більше серед найбільш холодостійких генотипів. Це вказує на зв'язок між даною маркерною ознакою та холодостійкістю соняшника. Імовірно, гени, що відповідають за ці ознаки, є зчепленими. Така сама ситуація склалася з посухостійкістю та маркерною ознакою «virescent». Таким чином, можна говорити, що гаметофітний добір на стійкість рослин до абіотичних стресів може змінювати генетичну структуру популяцій, що розщеплюються.

Раніше також були отримані подібні результати. Так, наприклад, прогрівання пилку гібридів рицини викликало істотне збільшення серед їх нащадків частки особин з маркерною ознакою, характерною для стійких до посухи генотипів [113]. Внаслідок витримування при зниженій температурі пилку гібридів  $F_1$  льону олійного у структурі популяцій  $BC_1$ , що розщеплюються, виявлені зміни за маркерною ознакою забарвлення віночка [68]. Також за кольором квіток змінювалася структура популяцій  $F_2$  після проведення гаметофітного добору на холодостійкість у нуту [20].

Проведення нами гаметофітного добору на жаростійкість змінило генетичну структуру популяції  $F_2$  за класами висоти рослин, тобто в цьому випадку гаметофітний добір змінив розподіл за кількісними морфологічними ознаками. Таким чином, гени, що детермінують висоту рослин та жаростійкість соняшника можна вважати хоча б частково зчепленими. Раніше вже було підтверджено збільшення частки високорослих рослин, рослин з довшою тривалістю періоду «сходи-цвітіння», зменшення частки рослин з бічними пагонами, або з великою їх кількістю під впливом гаметофітного добору на жаростійкість у соняшника [111]. Наші дослідження співпадають з цими результатами, оскільки в обох випадках спостерігається зміна структури популяції за висотою рослин. За періодом «сходи-цвітіння» та за висотою

рослин схожі результати були отримані при проведенні гаметофітного добору на холодостійкість у соняшника [107].

У льону олійного добір стійкого до підвищеної температури пилку гібридів  $F_1$  змінив структуру популяцій  $BC_1$ , що розщеплюються, де були виявлені зміни в співвідношенні рослин за різними кількісними ознаками (кількість бічних пагонів і кут їх відхилення, тривалість періоду «сходи-цвітіння») [14]. У сорго гаметофітний добір на посуху змінив структуру популяції  $F_2$  за такими кількісними ознаками як тривалість періоду «сходи-цвітіння», висота рослин, довжина волоті, ширина волоті, вага волоті, вага 1000 насінин та урожай насіння [18].

Вивчення зміни генетичної структури популяції  $F_2$  за висотою рослин проводили не лише під впливом прогрівання пилку гібридів  $F_1$ , але і під впливом прогрівання безпосередньо насіння  $F_2$ , а також спільної дії прогрівання пилку та насіння. Тобто в цьому випадку ми можемо говорити про порівняння дії гаметофітного (прогрівання пилку гібридів  $F_1$ ) та спорофітного (прогрівання насіння  $F_2$ ) доборів, а також їх спільного впливу. Отримані результати показують, що вплив спільної дії гаметофітного та спорофітного добору є більш ефективним та змінює генетичну структуру популяції  $F_2$  за класами висоти, збільшивши в популяції частку високорослих рослин, в той час як окрема дія цих доборів не змінила генетичну структуру популяції  $F_2$  за цією ознакою.

За літературними даними майже не зустрічається досліджень з порівняння дії спорофітного та гаметофітного добору. Однак, декілька експериментів у цьому напрямку вже було проведено. Так, Кільчевський та інші [9] вивчали зміну холодостійкості томатів під дією комбінованого добору, тобто добору за гаметофітом (на рівні пилку гібридів  $F_1$ ) та за спорофітом (на рівні насіння  $F_2$ ), і порівнювали з дією лише гаметофітного добору. За цими даними, комбінований добір був більш ефективним, ніж гаметофітний. Також ці дослідники провели роботу з вивчення циклічної дії гаметофітного та спорофітного доборів до покоління  $F_5$  та довели високу ефективність такої

методики, яка значно збільшила холодостійкість популяцій томатів, що розщеплюються.

Також відомо, що у ВНДІСНОК проводяться роботи з використання в селекції спільної дії гаметофітного та спорофітного доборів, в результаті чого вже отримано сорти ряду овочевих культур. Так, Мамедов та інші [15, 75], використовуючи по чергово добір на рівні спорофіту та на рівні гаметофіту, який в цьому випадку проводився у вигляді визначення життєздатності пилку після впливу низьких температур, отримали холодостійкий сорт перцю, що має назву «Пам'яті Жигалова».

Необхідно відзначити, що у соняшника спостерігається дуже висока конкуренція пилкових зерен під час запилення, оскільки кожна квітка має лише один насінневий зачаток, а на приймочку потрапляє велика кількість пилку. Зменшення, або збільшення конкуренції серед пилкових зерен може значно змінити генетичну структуру популяції  $F_2$  як за якісними, так і за кількісними ознаками, що вперше було продемонстровано у роботах Тер-Аванесяна [81]. Різна конкурентна здатність мікрогамет забезпечується, в тому числі, швидкістю росту пилкових трубок. Оскільки число пилкових зерен, що потрапляють на приймочку маточки, зазвичай в багато разів перевищує число яйцеклітин, швидкість росту пилкової трубки виступає в якості одного з основних факторів, що визначають імовірність успіху при її конкуренції з іншими трубками. Слід зазначити, що екстремальні фактори зовнішнього середовища також можуть змінювати конкурентну здатність пилку під час його проростання, забезпечуючи успішне проростання зазвичай неконкурентоспроможних пилкових зерен. Зміна конкурентної здатності може забезпечуватись обмеженням запиленням, коли для запилення використовується дуже мала кількість пилкових зерен. Таким чином, в перспективі цікаво провести запилення гібридів  $F_1$  соняшника обмеженою кількістю пилку та вивчити характер зміни генетичної структури популяції  $F_2$ , якщо така зміна буде спостерігатися. Зміна генетичної структури популяції  $F_2$  за якісними та кількісними ознаками після зміни інтенсивності конкуренції між пилковими зернами спостерігалася у ріпаку ярого, льону олійного та рицини [116, 117,

118]. Часто швидкість росту пилкової трубки корелює з такою фізіологічною ознакою як тривалість періоду «сходи-цвітіння» [116].

У літературних джерелах відмічається, що селекція соняшника зазвичай проводиться на стійкість до посухи та високої температури, а роботи з підвищення холодостійкості майже не проводяться [4]. Пропонується залучити для селекції соняшника на стійкість до понижених температур високогірні дикі види соняшника, а також види соняшника, ареал існування яких розташовано на півночі ареалу існування диких видів близьких до соняшника культурного. Підвищення холодостійкості дозволить збільшити ареал вирощування соняшника культурного та культивувати його у більш північних районах, де сьогодні його вирощування не проводиться. Таким чином, проведені нами роботи з гаметофітного добору на холодостійкість є досить актуальними для сьогоденної селекції соняшника культурного та дозволяють за рахунок використання пилкової селекції прискорити створення холодостійких сортів та гібридів соняшника культурного, що розширить ареал його культивування.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі наведено теоретичні узагальнення і нове вирішення наукового завдання з вивчення ефективності методів мікрогаметофітного добору на стійкість до абіотичних стресів у соняшника культурного. Це дозволяє підвищити жаро-, посухо- та холодостійкість популяцій спорофітів  $F_2$  за рахунок збільшення кількості стійких рослин завдяки зв'язку між чутливістю гаметофіту і спорофіту до абіотичних стресів.

За результатами дослідження зроблено наступні основні висновки:

1. Встановлено контрастність за стійкістю до абіотичних факторів середовища ліній соняшника, що були батьківськими компонентами гібридів першого покоління, які використовувались для проведення гаметофітного добору. Вплив абіотичних стресів на пилки гібридів  $F_1$  соняшника був суттєвим, що проявлялося у зменшенні проценту проростання пилкових зерен на штучному середовищі порівняно з контролем, і підтверджував ефективність дії стресу при проведенні гаметофітного добору.

2. Прогрівання пилку гібридів  $F_1$  при  $60^\circ\text{C}$  протягом 1-ї та 3-ох годин збільшує жаростійкість спорофітних популяцій  $F_2$  на 5,7-25,6%. Водночас така обробка пилку суттєво підвищувала посухостійкість на 39,6-47,3% та в цілому адаптаційні властивості на 11,9-24,4% отриманих популяцій.

3. Спільна дія гаметофітного (прогрівання пилку гібриду  $F_1$ ) та спорофітного (прогрівання насіння  $F_2$ ) доборів призводила до зміни структури популяції  $F_2$  за морфологічною кількісною ознакою «висота рослин», тоді як дія лише гаметофітного добору не завжди впливала на структуру популяцій  $F_2$  за цією ознакою. Одночасна зміна жаростійкості та структури популяцій  $F_2$  за висотою рослин після проведення гаметофітного добору, свідчить про хоча б часткове зчеплення генів, що детермінують термотолерантність гаметофіту та спорофіту, з генами, що визначають висоту рослин.

4. У результаті проведення добору в гетерогенних популяціях мікрогаметофітів шляхом нанесення 10%-вого розчину ПЕГ 6000 на приймочки

квіток гібридів  $F_1$  спостерігається підвищення стійкості популяції спорофітів  $F_2$  за рахунок збільшення в них частки посухостійких генотипів на 49,6%.

5. Проростання пилку гібридів  $F_1$  у присутності осмотика призводить до зміни генетичної структури популяції  $F_2$  за маркерною ознакою «*virescent*». При цьому спостерігається збільшення частини рослин з цією ознакою як у популяції  $F_2$  в цілому у 1,4-1,8 рази, так і у її найбільш посухостійкій частині у 4,3-9 разів порівняно з контролем. Зміна посухостійкості популяції  $F_2$  після проведення гаметофітного добору, що супроводжується зміною генетичної структури цієї популяції за маркерною ознакою «*virescent*», дозволяє стверджувати, що гени, які детермінують цю маркерну ознаку, зчеплені з генами, що визначають посухостійкість.

6. Витримування пилку гібридів  $F_1$  протягом 8 діб при 3°C впливало на холодостійкість популяцій  $F_2$  збільшуючи частку термотолерантних генотипів на 14-37%.

7. Селективна елімінація гамет у гетерогенних популяціях пилку гібридів  $F_1$  на фоні зниженої температури призводила до зміни генетичної структури популяцій спорофітів  $F_2$  за маркерними ознаками «карлик» та «дихотомічне жилкування», збільшуючи частку рослин з цими ознаками як в цілому у популяції, так і у її найбільш холодостійкій частині у 1,5-1,6 разів. Зміна структури популяції  $F_2$  за маркерною ознакою «дихотомічне жилкування», що відбувалася разом зі збільшенням холодостійкості цих популяцій, свідчить про те, що гени, які детермінують ознаки жилкування листа та холодостійкості, зчеплені між собою.

## РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ

Рекомендуємо в різних ланках селекційного процесу соняшника для підвищення жаро-, холодо- та посухостійкості популяцій спорифітів використовувати проведення гаметофітного добору.

Для збільшення жаростійкості популяцій рослин, що розщеплюються, пропонується прогрівання гетерогенної популяції свіжозібраного пилку при температурі  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 1-ї та 3-ох годин у сухоповітряному термостаті та запилення кастрованих суцвіть пилком одразу після його прогрівання.

З метою підвищення посухостійкості популяцій спорифітів рекомендується наносити на приймочки квіток 10%-вий розчин ПЕГ 6000, а після підсихання розчину проводити запилення свіжозібраним пилком.

Запилення рослин витриманим не менше 8 діб при  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  пилком пропонується проводити для збільшення холодостійкості популяцій рослин.

Проведення гаметофітного добору не викликає труднощів для селекціонера, оскільки не вимагає спеціального обладнання, великих трудовитрат та не потребує багато часу, але може значно прискорити селекційну роботу на стійкість соняшника до абіотичних факторів зовнішнього середовища.

УКРАЇНА

ДОДАТОК А

# ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 108818

СПОСІБ ВІДБОРУ ЖАРОСТНИКИХ ГЕНОТИПІВ  
СОНЯШНИКА КУЛЬТУРНОГО

Вилано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи  
і корисні моделі"

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи  
10.06.2015.

Голова Державної служби  
інтелектуальної власності України

 А.Г. Жаринова



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кириченко В.В., Коломацька В.П., Макляк К.М., Сивенко В.І. Виробництво соняшнику в Україні: стан і перспективи. Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області. 2010. Випуск 7. С 281-287.
2. Никитчин Д. И. Подсолнечник / Никитчин Д. И. – К.: Урожай, 1993. – 192 с.
3. Яровые масличные культуры / [Шпаар Д., Адам Л., Гтнапп Х. и др.]; Под общ. ред. В.А. Щербакова. – Минск: ФУАинформ, 1999. – 283 с.
4. Skoric D. Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses / D. Skoric // HELIA. – 2009. – V. 32, №. 50. – P. 1-16.
5. Гончаров С.В. Селекция линий и гибридов подсолнечника на скороспелость / С.В. Гончаров // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2011. – №2 (148-149). – С. 27-30.
6. Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J. and Farquhar, G.D., 2004. Breeding for high water use efficiency. J. Expt. Bot. 55: 2447–2460.
7. Калинова М.Г. Влияние отбора в период прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок гибридов  $F_1$  на холодоустойчивость потомства у ярового рапса / Калинова М.Г., Сорока А.И., Лях В.А. // Цитология и генетика. - 1998. – №5. - С.41-47.
8. Lyakh V. Pollen storage at low temperature as a procedure for the improvement of cold tolerance in spring rape, *Brassica napus* L. / Lyakh V., Soroka A., Kalinova M. // Plant breeding. – 1998. – Volume 117, №4. – P. 389-391.
9. Кильчевский А.В. Гаметная селекция томата на холодоустойчивость / А.В. Кильчевский, И.Г. Пугачёва // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2002. – №4. – С. 35-39.
10. Козлова В.М. Селекция томата на холодостойкость по спорофиту и микрогаметофиту / В.М. Козлова, Н.Н. Балашова // Доклады РАСХН. – 2000. – №3. – С. 7-12.

11. Eva Dominguez. Breeding tomato for pollen tolerance to low temperatures by gametophytic selection / Eva Dominguez, Jesus Cuartero, Rafael Fernandez-Munoz // *Euphytica*. –2005. – V. 142, I. 3. – P. 253-263.

12. Zamir, D., Tanksley, S.D., Jones, R.A., 1982. Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. *Genetics* 101: 129–137.

13. Лях В.А. Эффективность микрогаметофитного отбора на устойчивость кукурузы к температурному фактору / В.А. Лях, А.И. Сорока // *Сельхоз. биол.* - 1993. -№3. - С.38-44.

14. Мищенко Л.Ю. Отбор засухоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного / Л.Ю. Мищенко, В.А. Лях // *Вісник аграрної науки.* –1998. – №3. – С. 41-44.

15. Пивоваров В.Ф. Селекционные технологии, созданные во ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур на основе методов молекулярного анализа и селекции по микрогаметофиту / [Пивоваров В.Ф., Балашова И.Т., Балашова Н.Н. и др.] // *Сельскохозяйственная биология.* - 2005. - №3. - С.91-100.

16. Степанов В.А. Методические указания по селекции репы японской на холодостойкость с использованием микрогаметофита / Степанов В.А., Бунин М.С., Балашова Н.Н. / Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы) – М.: ВНИИССОК, 2000. – С.127-149.

17. Effect of temperature on gametophytic selection in a *Phalaenopsis* F<sub>1</sub> population / [Yeun-Kyung Chang, Leslie A. Blischak, Richard E. Veilleux, Muhammad J. Iqbal] // *Euphytica*. – 2010. – V. 171, I. 2. – P. 251-261.

18. Patil B. S. Effect of pollen selection for moisture stress tolerance on progeny performance in *Sorghum* / Patil B. S., Ravikumar R. L., Salimath P. M. // *Journal of Food, Agriculture & Environment.* – 2006. –V. 4, I. 1. – P. 201-204.

19. Anokhina V. The use of gametophytic selection for differentiation of lupin tolerance to stresses / Anokhina V., Duksina V., Sauk I. // *Lupin crops: an opportunity for today, a promise for the future. Proceedings of the 13th International Lupin Conference, Poznan', Poland, 6-10 June 2011.* – 2011. – P. 285-287.

20. Heather J. Clarke. Pollen selection for chilling tolerance at hybridisation leads to improved chickpea cultivars / Heather J. Clarke, Tanveer N. Khan, Kadambot H.M. Siddique // *Euphytica*. – 2004. – Volume 139, Issue 1. – P. 65-74.
21. Hormaza, J.I., Herrero, M., 1992. Pollen selection. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 663–672.
22. Mulcahy D.L. The rise of angiosperms: a genecological factor / D.L. Mulcahy // *Science*. – 1979. – V. 206, I. 4414. – P. 20-23.
23. Ottaviano, E., Mulcahy, D.L., 1989. Genetics of angiosperm pollen. *Advances in Genetics* 26: 1–64.
24. Жизнь растений: в 6 т. – М.: Просвещение, 1981. – Т. 5(2): Цветковые растения. – 512 с.
25. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур / Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. - Запорожье: ЗНУ, 2009. - 266 с.
26. Onemli F. Response to drought of some wild species of *Helianthus* at seedling growth stage / F. Onemli, T. Gucer // *Helia*. – 2010. – V. 33, №. 53. – P. 45–54.
27. Жученко А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы). Теория и практика: в 3 т. / А.А. Жученко. – М.: Агрорус, 2009. – Т.2. – 1098 с.
28. Жученко А.А. Роль репродуктивного направления селекции культурных растений / А.А. Жученко; под ред. В.Ф. Пивоварова // *Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы)*. – М.: ВНИИССОК, 2001. – С. 7-46.
29. Кильчевский А.В. Экологическая селекция растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Мн.: «Тэхналогія», 1997. – 372 с.
30. Вареник Б.Ф. Селекція соняшнику на стійкість до основних біотичних та абіотичних факторів в СГІ-НЦНС / Б.Ф. Вареник // *Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН*. – Запоріжжя: ІОК УААН, 2009. – С. 97-102.
31. Пивоваров В.Ф. Современные тенденции в селекции овощных культур. Доклад на I Международной научно-практической конференции

«Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы», ВНИИСОК, август 2008 / В.Ф. Пивоваров // Овощи России. – 2008. – №1-2. – С.26-29.

32. Токар І. В., Кириченко В. В. Реакція нових гібридних комбінацій соняшнику на теплові удари // Вісник Сумського НАУ. Сер. Агронія і біологія. – 2002. – Вип. 6. – С. 100-102.

33. Практикум по росту и устойчивости растений: учебное пособие / [Полевой В.В., Чиркова Т.В., Лутова Л.А. и др.]; Под ред. В.В. Полевого, Т.В. Чирковой. - СПб.: С.-Петербург. ун-т, 2001.-212 с.

34. Токар І. В., Кириченко В. В. Оцінка стійкості соняшнику до високої температури проростання та посухи // Селекція і насінництво. – Харків, 2000. – Вип. 83. – С. 87-91.

35. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин / М.М. Мусієнко. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 392 с.

36. Гладышко С.Н. Создание исходного материала для селекции огурца для открытого грунта Нечерноземной зоны России : дис. на получение науч. степени канд. сельскохозяйственных наук : 06.01.05. «Селекция и семеноводство» / С.Н. Гладышко. - Москва, 2002. - 183 с.

37. Сиротин А.А. Элементы водного режима подсолнечника в зависимости от факторов среды / Сиротин А.А., Сиротина Л.В., Трифонова М.Ф. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2007. – Т. 5. – №5. – С. 25-28.

38. А.В. Барбашев. Электрическая реакция на температурное воздействие проростков линий кукурузы. Химия растительного сырья. 2004. №4. С. 49–51.

39. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода. Н.Н. Грищенко, А.С. Лукаткин. Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3 – 11.

40. Paula Fernandez. Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis / [Paula Fernandez, Julio Di Rienzo, Luis Fernandez, H Esteban Hopp,

Norma Paniego, Ruth A Heinz.] // BMC Plant Biology. – 2008. – 8:11. – P. 1-18. – <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/11>.

41. Крупнов В.А. Засуха и селекция пшеницы: системный подход / В.А. Крупнов // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №1. – С. 12-23.

42. Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance. Saeed Rauf. Communications in Biometry and Crop Science Vol. 3, No. 1, 2008, pp. 29–44.

43. Examination of characters, isotope discrimination, physiological and morphological traits and their relationship used to identify the drought tolerant sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes / [Nagarathna T.K., Shadakshari Y.G., Ramakrishna Parama V.R. and etc.] // Helia. – 2012. – V. 35, №56. – P. 1-8.

44. Гончарова Э.А. Стратегия диагностики и прогноза устойчивости сельскохозяйственных растений к погодно-климатическим аномалиям / Э.А. Гончарова // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №1. – С. 24-31.

45. Жанг Доанг Хоанг. Исследование засухоустойчивости перспективных для интродукции видов *Momordica Charantia* L. и *M. Balsamina* L. (*Cucurbitaceae*) / Доанг Хоанг Жанг, В.К. Тохтарь // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2011. – Вып. 15. – №9 (104). – С.43-47.

46. Прогноз засухоустойчивости по содержанию абсцизовой кислоты и изучение возможности упрощения процедуры её количественной оценки в растениях пшеницы / [Веселов С.Ю., Шарипова Г.В., Тимергалин М.Д. и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.13. – №5 (3). – С. 17-20.

47. Effect of osmotic stress on abscisic acid levels in xylem sap of sunflower (*Helianthus annuus* L.) G. V. Ttoad. Planta (Berl.) 124, 25--29 (1975)

48. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). S. Poormohammad Kiani, P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel, A. Sarrafi. Theor Appl Genet (2007) 114:193–207

49. Biochemical indicators of water stress in sunflower seedlings. A. L. Garcia, A. Torrecillas, A. Leon and M. J. Sanchez-Blanco. Biologia plantarum (PRAHA) 29 (6): 473--475, 1987.

50. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2011. - №2 (76). – С. 32-34.

51. Волкова А.М. Определение жаро- и засухоустойчивости рапса по ростовой реакции проростков после прогревания и завядания: методические указания / А.М. Волкова, А.П. Либрихт. – Л.: ВИР, 1989. – 12 с.

52. Грабовська Т.О. Комплексна діагностика та добір селекційного матеріалу кукурудзи плазми фйодент на посухостійкість / Т.О. Грабовська // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 2007. – С. 116-121.

53. Brink, R.A., 1925. Mendelian ratios and the gametophyte generation in angiosperms. *Genetics* 10: 359-394.

54. Mangelsdorf P.C., Jones D.F. The expression of mendelian factors in the gametophyte of maize. *Genetics*, 1926. 11: 423-456.

55. Barabas B., Kovacs G. Perspectives of pollen and male gamete selection in cereals // *Plant sperm cells as tool for biotechnology*. – Wageningen, Oudoc, 1988. – P.136-150.

56. Evolutionary stasis in *Euphorbiaceae* pollen: selection and constraints / [Matamoro-vidal A., Furness C. A., Gouyon P.-H., and et.] // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2012. – V. 25, I. 6. – P. 1077–1096.

57. Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы) : [ред. В.Ф. Пивоваров]. – М. : ВНИИССОК, 2001. – 386 с.

58. К вопросу об адаптации микрогаметофита овощного гороха к различным условиям освещения / [Суслова Л.В., Балашова Н.Н., Епихов В.А. и др.] // *Научн. тр. по селекции и семеноводству (к 75-летию ВНИИССОК)*. – М., 1995. – Т.1. – С. 255-261.

59. Filomena Giorno, Mieke Wolters-Arts, Celestina Mariani and Ivo Rieu. Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants* 2013, 2, 489-506.

60. Tanksley S.D., Zamir D., Rick C.M. Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum* // Science. – 1981. – 213. – P. 453-455.
61. Sari Gorla M., Frova C., Binelli G., Ottaviano E. Extent of haplo-diploid gene expression in maize // Maize Genet. Cooper. News Lett. – 1983. – 58. – P. 145-146.
62. Rajora O.P., Zsuffa L. Sporophytic and gametophytic gene expression in *Populus deltoids Marsh.*, *P. nigra L.*, and *P. maximowiczii Henry* // Canad. J. Genet. Cytol. – 1986. – 28. – P. 476-482.
63. Willing R.P., Mascarenhas J.P. Analysis of complexity and diversity of mRNAs from pollen shoots of *Tradescantia* // Plant Physiol. – 1984. – 75. – P. 865-868.
64. Лях В.А. Микрогаметофитный отбор и его роль в эволюции покрытосеменных растений // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29. № 6. – С. 76-82.
65. Кравченко А.Н. Особенности элиминации гамет у растений / А.Н. Кравченко // Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке. – М.: ВНИИССОК, 2000. – Т.1. – С. 282-283.
66. Pollen selection: a transgenic reconstruction approach (in vitro pollen maturation/hygromycin B/male gametophyte selection). Alisher Touraev, Christine S. Fink, Eva Stoger, and Erwin Heberle-Bors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Plant Biology Vol. 92, pp. 12165-12169, December 1995
67. Rodriguez-Garay, B., Barrow, J.R., 1988. Pollen selection for heat tolerance in cotton. Crop Science 28: 857–859.
68. Методы отбора ценных генотипов на уровне пыльцы / [Лях В.А., Сорока А.И., Мищенко Л.Ю. и др.] – Запорожье: ИМК УААН, 2000. – 48 с.
69. Sacher, R.F., Mulcahy, D.L., Staples, R.C. 1983. Developmental selection during self-pollination of *Lycopersicon Solanum* F<sub>1</sub> for salt tolerance of F<sub>2</sub>. In: Proc Symposium, Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding, New York, pp. 329–334.

70. Searcy, K.B., Mulcahy, D.L., 1985. Pollen selection and the gametophytic expression of metal tolerance in *Silene dioica* (Caryophyllaceae) and *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). American Journal of Botany 72: 1700–1706.

71. Sari Gorla, M., Ottaviano, E., Frascaroli, E., Landi, P., 1989. Herbicide-tolerant corn by pollen selection. Sexual Plant Reproduction 2: 65–69.

72. Frascaroli E., Landi P., Villa M. Effect of pollen selection for alachor tolerance in maize // Crop. Sci. – 1995. – Vol. 35. – P. 1322-1326.

73. Hodgkin, T., 1990. In vitro pollen selection in *Brassica napus* L. for resistance to phytotoxic compounds from *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wilts. Sexual Plant Reproduction 2: 116–120.

74. Пыльцевая селекция сельскохозяйственных растений на устойчивость к возбудителям грибных болезней / [Балашова Н.Н., Морозова Н.А., Простакова Ж.Г. и др.] // Известия АН РМ: Биологические и химические науки. – 1992. - №2. – С. 3-11.

75. Мамедов М.И. Разработка технологии селекционного процесса сортов перца сладкого для регионов с пониженной теплообеспеченностью / Мамедов М.И., Пышная О.Н., Енгальчева И.А. // Овощи России. – 2008. – №1-2. – С.34-37.

76. К вопросу о роли микрогаметофита в адаптации растений к эконише возделывания / [Балашова Н.Н., Валеева З.Т., Игнатов А.Н. и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 1994. - №3. – С. 59-64.

77. Ottaviano E., Petroni O., Pe E. Gametophytic expression of genes controlling endosperms development in maize // Theor. and Appl. genet. – 1988. – 75. – P. 252-258.

78. Zamir D., Vallejos E.C. Temperature effects on haploid selection of tomato microspores and pollen grains // Pollen: Biol. and Implic. for Plant Breed. – New York, 1983. – P. 335-342.

79. Pederson S., Simonsen V., Loeschcke V. Overlap of gametophyte and sporophytic gene expression in barley // Theor. and Appl. Genet. – 1987. – 75. – P. 200-206.

80. Кравченко А.Н., Лях В.А., Тодераш Л.Г., Салтанович Т.И., Паскал М.К. Методы гаметной и зиготной селекции томатов. Кишинёв. Штиинца. – 1988. – 152 с.
81. Ter-Avanesian D.V. The effect of varying the number of pollen grain used in fertilization / D.V. Ter-Avanesian // *Theor. and Appl. genet.* – 1978. – V.62. - №2. – P.77-79.
82. Mulcahy D.L., Mulcahy G.B. The influence of gametophytic competition on sporophytic quality in *Dianthus sinensis* // *Theor Appl. Genet.* – 1975. – 46. – P. 277-280.
83. Bond C.J. The influence of pollen maturity and restricted pollination on a simple mendelian ratio in the pea // *J. Genet.* – 1927. – 18. – P. 268-281.
84. Snow A. Pollination dynamics in *Epilobium canum* (*Onagraceae*): Consequences for gametophytic selection // *Amer. J. Bot.* – 1986. – 73. – P. 139-151.
85. Zamir D., Jones R.A. Estimates of the number of pollen grains applied to a stigma in a single pollination // *Tomato Genet. Coo.* – 1981. – 31. – P. 21.
86. Ottaviano E., Sari Gorla M., Mulcahy D.L. Pollen selection: efficiency and monitoring // *Isozymes: Structure, function and use in boil. and medicine.* – Willey-Liss. Inc., 1990. – P. 575-588.
87. Lee T.D. Patterns of fruit maturation: A gametophytic competition hypothesis // *Amer. Nature.* – 1984. – 123. – P. 427-432.
88. Алпатьев А.В., Юрьева Н.А. Возможности изменения характера расщепления томатов в F<sub>2</sub> // *Генетика.* – 1971. – Т.7, № 11. – С. 12-20.
89. Winson J.A., Davis L.E., Stephenson A.G. The relationship between pollen load and fruit mutation and the effect of pollen load on offspring vigor in *Cucurbito pepo* // *Amer. Natur.* – 1987. – V. 129, № 5. – P. 643-656.
90. Bjorkman T. The effect of pollen load and pollen grain competition on fertilization success and progeny performance in *Fagopyrum esculentum* // *Euphytica.* – 1995. – 83. – P. 47-52.
91. Ottaviano E., Sari Gorla M., Villa M. Pollen competitive ability in maize: within population variability and response to selection // *Theor. Appl. Genet.* – 1988. – 76. – P. 601-608.

92. Сенин И.В. Изменчивость и наследуемость некоторых признаков семенного растения моркови / Сенин И.В., Балашова Н.Н., Тимин Н.И. // Научн. тр. по селекции и семеноводству (к 75-летию ВНИИССОК). – М., 1995. – Т.1. – С. 263-269.

93. Простакова Ж.Г. Реакция пыльцы на токсин как тест система оценки устойчивости сои к фузариозу / Простакова Ж.Г., Бронштейн А.И., Балашова Н.Н. // Сельхоз. биол. - 1993. -№3. - С.32-37.

94. Способ оценки устойчивости сортов сои к *Fusarium oxysporum* / [Балашова Н.Н., Бронштейн А.И., Простакова Ж.Г., Показаньева Л.Н.] // Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы). – М.: ВНИИССОК, 2001. – С. 98-106.

95. Jourden C, Simonneaux D and Renard M, (1996). Selection on pollen for linolenic acid content in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 115: 11–15.

96. Перспективы использования гаметной и гомозиготной селекции для улучшения плодовых растений / [Жуков О.С., Олейникова О.Я., Савельев Н.И., Лучникова С.В.] // Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке. – М.: ВНИИССОК, 2000. – Т.1. – С. 247-249.

97. Hickok LG, Vogelien DL and Warne TR, (1991). Selection of mutation conferring high NaCl tolerance to gametophyte of *Ceratopteris*. *Theor. Appl. Gen.* 81: 293–300.

98. Мосунов С.А. Анализ мужского гаметофита сортов табака сортотипов остролист и самсун / Мосунов С.А., Цаценко Л.В., Иваницкий К.И. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета - 2006. – №4 (24). - С.23-26.

99. Pfeiffer T.W. Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of 2N egg and 4N pollen formation / T.W. Pfeiffer, E.T. Bingham // Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1983. Vol. 25. № 2. P. 107-112.

100. Пивоваров В.Ф. Перспективы развития приоритетных направлений в селекции и семеноводстве овощных культур / Пивоваров В.Ф., Балашова Н.Н., Балашова И.Т. // Сельскохозяйственная биология. - 2003. - №3. - С.3-10.

101. Лях В. А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними: монография / В. А. Лях, А. И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2008. – 182 с.
102. Pfachler P.L. Comparative effectiveness of pollen genotype selection in higher plants // Proc. Symp. Pollen: Biol. and Implic. for Plant Breed. – New York. etc., 1983. – P. 361-366.
103. Калинова М.Г. Связь между холодоустойчивостью гаметофита и спорофита у рапса ярового / Калинова М.Г., Сорока А.И., Лях В.А. // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 1997. – С. 10-14.
104. Мищенко Л.Ю. Селекция холодоустойчивых генотипов в мужском гаметофитном поколении у льна масличного / Мищенко Л.Ю., Сорока А.И., Лях В.А. // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 1998. – С. 34-38.
105. Мищенко Л.Ю. Влияние хранения пыльцы *Linum Usitatissimum* при различных температурах на её качество / Л.Ю. Мищенко, В.А. Лях // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 1997. – С. 38-41.
106. Lyakh, V.A., Soroka, A.I., 1992. Influence of pollen storage in tassel on the quality of pollen grains and structure of resulting populations. *Maydica* 37: 299-303.
107. Гасенко Н.В. Отбор холодоустойчивых генотипов на стадии зрелой пыльцы у подсолнечника / Н.В. Гасенко, В.А. Лях // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 1997. – С. 1-4.
108. Селекция огурца на устойчивость к корневым гнилям / [Настенко Н.В., Шмыкова Н.А., Балашова Н.Н., Кушнерева В.П.] // Научн. тр. по селекции и семеноводству (к 75-летию ВНИИССОК). – М., 1995. – Т.2. – С. 31-40.
109. Фотев Ю.В. Исходный материал для селекции томата с устойчивостью к стрессовым температурам и болезням: автореф. дисс. на соиск. степ. канд. с.-х. наук. 06.01.05 / Ю.В. Фотев. – М. 1992. – 21 с.

110. Жученко А.А. Электрофоретическая оценка расщепляющихся популяций межвидовых гибридов томатов при отборе гамет по теплоустойчивости / Жученко А.А., Лях В.А., Кибенко Т.Я. // Гаметная и зиготная селекция растений. – Кишинёв, 1987. – С. 41-44.

111. Lyakh V.A. Influence of pollen heating on the quality of resulting sporophyte generation in sunflower / Lyakh V.A., Gasenko N.V., Soroka A.I. // *Helia*. – 1998. – V.21. – Issue 29. – P. 103-108.

112. Міщенко Л.Ю. Мікрогаметофітний добір на стійкість до абіотичних факторів середовища та скоростиглість у льону олійного: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. сільськогосподарських наук: спец. 03.00.15 „Генетика” / Л. Ю. Міщенко. — Запоріжжя, 1999. — 17 с.

113. Одинец С.И. Исследование засухоустойчивости клещевины на микрогаметофитном уровне / С.И. Одинец, В.А. Лях // Научно-технический бюллетень Института олійних культур УААН. – Запоріжжя: ІОК УААН, 1997. – С. 42-44.

114. V. S. Koval 2000. Male and female gametophyte selection of barley for salt tolerance. *Hereditas*, 132: 1-5.

115. Male gametophytic and sporophytic screening of olive cultivars for salt stress tolerance. A. Soleimani, A. R. Talaie, M. R. Naghavi, Z. Zamani. *J. Agr. Sci. Tech.* (2010) vol. 12: 173-180.

116. Мищенко Л.Ю. Влияние отбора по конкурентоспособности пыльцы на соотношение по скороспелости потомства гибридов льна масличного / Л.Ю. Мищенко, В.А. Лях // *Цитология и генетика*. - 1998. - №4. - С.31-36.

117. Лях В.А. Отбор скороспелых генотипов ярового рапса на микрогаметофитном уровне / В.А. Лях, А.И. Сорока // *Сельхоз. биол.* - 1998. - №3. - С.40-43.

118. Мирошниченко Е.Н. Изменение структуры популяций  $F_2$  в зависимости от интенсивности микрогаметофитной конкуренции в  $F_1$  у *Ricinus communis* L. / Е.Н. Мирошниченко, В.А. Лях // *Цитология и генетика*. - 1999. - №3. - С.73-77.

119. Ottaviano E., Sari Gorla M., Pe E. Male gametophytic selection in maize // *Theor. and Appl. Genet.* – 1982. – 63. – P. 249-254.

120. Никонова В.Н. Влияние отбора в F<sub>1</sub> пыльцы, устойчивой к токсину *Fusarium Oxysporum*, на некоторые количественные признаки растений в популяциях F<sub>2</sub> клещевины / В.Н. Никонова, В.А. Лях // *Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН.* – Запоріжжя: ІОК УААН, 2004. – С. 67-73.

121. Разработка метода отбора микро- и макроспор люцерны на устойчивость к культуральному фильтрату возбудителя фузариоза / [Мазин В.В., Соложенцев П.Д., Острцова И.Н., Соложенцева Л.Ф.] // *Генетические основы селекции сельскохозяйственных растений (к 75-летию ВНИИССОК).* – М., 1995. – С. 128-135.

122. Использование гаметофитного отбора для дифференцирования селекционных образцов томата по фузариозоустойчивости / [Анохина В.С., Тимошенко М.К., Пискун С.Г., Кильчевский А.В.] // *Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке.* – М.: ВНИИССОК, 2000. – Т.1. – С. 97-98.

123. Использование методов пыльцевого отбора в оценке селекционного материала на устойчивость к кладоспориозу / [Валько О.В., Поликсенова В.Д., Анохина В.С., Тимошенко М.К.] // *Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке.* – М.: ВНИИССОК, 2000. – Т.1. – С. 148-149.

124. Можливості гаметофітного добору на стійкість пшениці до *Fusarium Graminearum Schwabe* / Коломієць Л.В., Волощук С.І., Волощук Г.Д., Гірко В.С. // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.* – К.: логос, 2001. – Т. 2. – С. 297-305.

125. Мелиян Л.Г. Пыльцевая селекция томата на устойчивость к токсинам *Alternaria solani S.* / Л.Г. Мелиян // *Селекция растений: новые генетические подходы и решения.* – Кишинёв, 1991. - С.245-252.

126. Мелиян Л.Г. Метод пыльцевой селекции растений на устойчивость к фитопатогенам (на примере томата) / Л.Г. Мелиян, Н.Н. Балашова // *Сельскохозяйственная биология.* - 1994. - №1. - С.121-129.

127. Ravikumar, R.L., and S.B. Chikkodi, 1998. Association between sporophytic reaction to *Alternaria helianthi* and gametophytic tolerance to pathogen culture filtrate in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 103: 173–180.

128. Dominguez, E., Cuartero, J. and Fernandez-Munoz, R. 2006. Sporophytic and gametophytic recurrent selection for improvement of partial resistance to *Alternaria* leaf blight in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 147: 421-431.

129. Стусь Н.А., Сорока А.И. О возможной связи устойчивости гаметофита и спорофита подсолнечника к болезням [На примере пепельной гнили (возб. *Sclerotium bataticola*)] // Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур. – 2001. – Вып. 124. – С. 163-165.

130. Методические указания по технологии пыльцевой селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу / [Чумакова А.И., Макаров А.А., Политыко В.И. и др.] // Гетерозис сельскохозяйственных растений. Межд. Симп. 1-5 декабря 1997. – М.: 1997. – С. 167-172.

131. Gametophytic selection for wilt resistance and its impact on the segregation of wilt resistance alleles in chickpea (*Cicer arietinum* L.) / [Ravikumar R. L., Chaitra G. N., Choukimath Anilkumar M., Soregaon C. D.] // *Euphytica*. – 2013. – V. 189, I. 2. – P. 173-181.

132. Шмыкова Н.А. Перспективы использования мужского гаметофита в селекции лука репчатого / Шмыкова Н.А., Агафонов А.Ф., Шкляр С.Н. // Научн. тр. по селекции и семеноводству (к 75-летию ВНИИССОК). – М., 1995. – Т.1. – С. 170-175.

133. Агафонов А.Ф. Использование мужского гаметофита в селекции лука репчатого на устойчивость к бактериозу / А.Ф. Агафонов, Н.А. Шмыкова // Методические указания по селекции луковых культур. – М., 1997. – С. 28-31.

134. Жизнеспособность микрогаметофита белокочанной капусты под влиянием возбудителей бактериозов и килы / [Балашова Н.Н., Игнатов А.Н., Самохвалов А.Н. и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 1995. – №5. – С. 115-118.

135. Кильчевский А.В. Результаты циклической гаметофитной и спорофитной селекции томата на холодостойкость и продуктивность /

Кильчевский А.В., Антропенко Н.Ю., Пугачева И.Г. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2007. – №2. – С. 53-57.

136. Soroka A.I. Genetic variability in sunflower after mutagen treatment of immature embryos of different ages / A. Soroka, V.Lyakh // *Helia*. - 2009. - V. 32, №51. - P. 33-45.

137. Lyakh, V., Soroka, A., Vasin, V., 2005. Influence of mature and immature sunflower seed treatment with ethylmethanesulphonate on mutation spectrum and frequency. *Helia* 28: 87–98.

138. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Доспехов Б. А. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

139. Keshava Murthy M.N., Nanja Reddy Y.A., Virupakshappa K. Development of suitable germination medium for trinucleate pollen grains: an illustration with sunflower // *J. Oilseeds Res.*, 1944. V11, № 2: 304-307.

140. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику / Айала Ф.; пер. с англ. А. Д. Базыкина. – М.: Мир, 1984. – 232 с.

141. Лакин Г. В. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. / Лакин Г. В. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

142. V.A. Lyakh and I.V. Totsky. Heat tolerance and adaptability to drought in sunflower can be influenced by pollen selection. – *Helia*. – V. 37. I. 60. – 2014. – P. 77-86.

143. Тоцкий И.В., Витковская Ю.С., Лях В.А. Влияние микрогаметофитного отбора у гибридов F<sub>1</sub> подсолнечника на устойчивость спорофитных популяций F<sub>2</sub> к различным абиотическим факторам внешней среды. – Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – №2. – 2014. – С. 31-38.

144. Тоцкий И.В., Лях В.А. Гаметофитный отбор на жаростойкость у подсолнечника культурного. – Вісник Донецького національного університету. Серія А. Природничі науки. – №2. – 2014. – С. 156-160.

145. Тоцкий И.В., Лях В.А. Гаметофитный отбор на жаростойкость у подсолнечника культурного. VI съезд Вавиловского общества генетиков и

селекционером (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы. – 15-20 июня 2014. – Ростов-на-Дону. – С. 181. (Новосибирск: Издательство СО РАН.)

146. Спосіб відбору жаростійких генотипів соняшника культурного : а 2014 04951 UA : МПК<sup>51</sup> А01Н 1/04 / В.А. Лях, І.В. Тоцький (UA). – № 108818; заявл. 12.05.14 ; опубл. 10.06.15, Бюл. № 11. – 4 с.

147. Тоцкий И.В., Лях В.А. Определение засухоустойчивости некоторых мутантных линий подсолнечника культурного. – Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – №1. – 2014. – С. 21-30.

148. Тоцкий И.В., Лях В.А. Влияние микрогаметофитного отбора у гибридов F<sub>1</sub> подсолнечника на устойчивость популяций F<sub>2</sub> к осмотическому стрессу. IV Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». Запорізький національний університет, Науково-практичний центр Академії наук Білорусі з біоресурсів, Інститут біології та охорони довкілля Поморської академії, Інститут паразитології ім. Стефаньського Польської академії наук, Університет дю Мен, Інститут біорізноманіття та еволюційної біології ім. Каваніллес. – 13-15 травня 2015. – Запоріжжя: ЗНУ. – С..

149. V. A. Lyakh and I. V. Totsky. Selective elimination of gametes during pollen storage at low temperature as a way to improve the genetic structure of sporophytic population for cold tolerance. – Helia. – V. 37. I. 61. – 2014. – P. 227-235.

150. Тоцкий И.В., Лях В.А. Микрогаметофитный отбор как способ повышения холодоустойчивости у подсолнечника. – Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення. – Випуск 23. № 63. – 2014. – С. 57-64.