

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ IN-VITRO У ВИДОВ И СОРТОВ КЛАРКИИ (*CLARKIA PURSH*)

E.V. Королева¹, Ю.В. Фотев^{1,2}

¹*Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия*

²*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия*

E-mail: coroleva-nsk@yandex.ru

Виды кларкии, рода *Clarkia Pursh* – ценные для Сибири и России цветочно-декоративные растения, требующие биотехнологического подхода для ускорения селекции. С целью определения жизнеспособности пыльцы кларкии, от которой зависят процессы оплодотворения и развития семян, использовали проращивание пыльцы *in-vitro* на растворе синтетического осмотика – полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ 6000). По сравнению с раствором сахарозы на 30 % растворе ПЭГ 6000 с добавлением в среду микроэлементов в следующих концентрациях: борной кислоты H_3BO_3 – 0,01%, нитрата кальция $CaNO_3$ – 0,03%, сульфата магния $MgSO_4$ – 0,02%, нитрата калия KNO_3 – 0,01%. энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен увеличивается в 1,7–2 раза. Установлено, что энергетическая активность, жизнеспособность пыльцы и скорость роста пыльцевых трубок у исследованных видов и сортов рода *Clarkia Pursh* из трех различных секций (*Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma*) чувствительны, как к среде культивирования, так и к продолжительности времени культивирования.

Ключевые слова: *Clarkia Pursh*, секции *Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma* селекция, жизнеспособность пыльцы, *in-vitro*, скорость роста пыльцевых трубок

IN-VITRO METHOD FOR DETERMINING THE POLLEN VIABILITY OF CLARKIA SPECIES AND CULTIVARS

E.V. Koroleva¹, Yu.V. Fotev^{1,2}

¹*Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia*

²*Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia*

Clarkia species of the genus *Clarkia Pursh* are valuable floral and ornamental plants for Siberia and Russia, which require a biotechnological approach to accelerate breeding. To determine the viability of *Clarkia* pollen, on which the processes of fertilization and seed development depend, we used in vitro germination of pollen in a solution of a synthetic osmotic agent, polyethylene glycol with a molecular weight of 6000 (PEG 6000). Compared to a sucrose solution in a 30% PEG 6000 solution with the addition of microelements to the medium in the following concentrations: boric acid H_3BO_3 - 0.01%, calcium nitrate $CaNO_3$ - 0.03%, magnesium sulfate $MgSO_4$ - 0.02%, potassium nitrate KNO_3 – 0.01%. the energy activity and viability of pollen grains increases by 1.7–2 times. It has been established that energy activity, pollen viability, and pollen tube growth rate in the studied species and varieties of the genus *Clarkia Pursh* from three different sections (*Rhodanthos*, *Godetia*, and *Phaeostoma*) are sensitive to both the cultivation environment and the duration of cultivation time.

Keywords: *Clarkia Pursh*, sections *Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma* selection, pollen viability, *in-vitro*, pollen tube growth rate

Кларкия (*Clarkia Pursh*) – однолетние, травянистые, декоративно-цветущие растения, относящиеся к семейству кипрейные (Onagraceae Juss). Известно 42 вида кларкии и почти все они являются эндемиками западной части Северной Америки. В декоративном садоводстве и цветоводстве распространены сорта кларкии прелестной (*C. amoena* (Lehm.) A. Nelson & J. F. Macbride), включающей подвиды *C. amoena* subsp. *lindleyi* (Douglas) H. Lewis & M.E. Lewis, *C. amoena* subsp. *whitneyi* (A. Gray) H. Lewis & M. E. Lewis; кларкии ноготковой *C. unguiculata* Lindl. и *C. pulchella* Pursh, особенно широко культивируемой в Европе. Виды кларкии и выведенные из них сорта используются в ландшафтном дизайне для оформления различных цветников, миксбордеров, групп, мавританских газонов, в бордюрных посадках, в контейнерном цветоводстве – для оформления вазонов, подвесных корзин, в фитодизайне и на срез [1].

От продуктивных качеств пыльцы зависят процессы оплодотворения и развития полноценного семени и жизнеспособности потомства, что особенно актуально для однолетних видов кларкии, размножаемых только семенами. Скорость роста пыльцевой трубки — одна из основных составляющих селективной ценности гаметофита [2]. В настоящее время, пыльцевая селекция широко применяется как экспресс-метод для оценки реакции генотипов на различные абиотические стресс-факторы, токсические вещества и патогены, для оценки устойчивости разных видов растений к высоким и низким температурам [3].

По литературным данным пыльца у кларкии крупная, соединена висциновыми нитями, пыльцевые зерна достигают в длину 100-150 мкм, подавляющее большинство образцов пыльцы, представляли собой очень рыхло агрегированные пыльцевые массы, которые, были более подвержены переносу от пчелы к цветку [4]. А. А. Hove и S. J. Mazer [5] считают, что на конкурентоспособность пыльцы кларкии могут влиять различные морфометрические характеристики, включая размер пыльцы и объем пыльцевых зерен. Эти авторы также выявили, что характеристики пыльцы после самоопыления и перекрестного опыления не различались ни в пределах самоопыляющихся, ни в ауткрossирующих таксонах и высказали предположение, что система размножения и качество пыльцы могут эволюционировать у *Clarkia* совместно, но на продуктивность пыльцы в естественных популяциях явно влияют и другие факторы [5]. Для прорастания пыльцы необходимы определенные условия: температура, влажность, состав среды и другие [6]. Основными компонентами обычно используемых сред для проращивания пыльцы являются сахароза и борная кислота [7,8].

Для видов кларкии из коллекционного фонда ФГБОУ ВО Новосибирского ГАУ, в основном, ауткрossинговых актуально изучение энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен *in-vitro* в целях совершенствования методов селекции. Поэтому была поставлена цель: изучить морфометрические и физиологические качества пыльцы у разных видов и сортов кларкии, включая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен в культуре *in-vitro*.

Объекты, методы и методика исследования.

Для расширения промышленного ассортимента декоративно-цветущих однолетних растений и использовании их в озеленении населенных пунктов юга Западной Сибири на базе Новосибирского ГАУ (55.0312880, 82.9903190) в 2010 г. была начата селекционная работа с перспективными интродуктантами рода *Clarkia*.

Объекты исследования – пыльца видов и сортов кларкии из трех различных секций: секция *Rhodanthos*: *C. amoena* сорт Малиновая чаша (патент № 13349 от 08.02.2024) и подвид *C. amoena* subsp. *lindleyi* сорт Персиковая чаша (патент № 13357 от 08.02.2024), секция *Godetia*: *C. purpurea* (Curtis) A. Nelson & J. F. Macbride сорт Лиловая фея (патент № 13350 от 08.02.2024), секция *Phaeostoma*: *C. unguiculata* Lindl. Коралловые рифы (патент № 13359 от 08.02.2024).

Методика включала следующие этапы:

1) Сбор пыльцы с цветков кларкии. Пыльца собирается с каждого вида и (или) сорта кларкии – отдельно, не допуская смешивания образцов, в фазе полного цветения (50-75 % раскрытых цветков);

2) Культивирование пыльцы *in-vitro* и оценка роста пыльцевых трубок: производится на стерильном предметном стекле, в капле среды, содержащей ПЭГ 6000 в концентрации 30 % с добавлением микроэлементов: борной кислоты H_3BO_3 – 0,01 %, нитрата кальция $Ca(NO_3)_2$ – 0,03

%, сульфата магния $Mg SO_4$ – 0,02 %, нитрата калия KNO_3 – 0,01 % и тщательно перемешивают; затем предметное стекло с культивируемой пыльцой кладут между слоями влажной фильтровальной бумаги в закрытую чашку Петри и ставят для проращивания в термостат при постоянной температуре 25 °C; Контроль активности и жизнеспособности пыльцы проводят через 4 часа, а конечный результат анализируется через 24 часа. Для контрольного варианта мы использовали среду с замещением раствора ПЭГ 6000 на раствор с оптимальной 15 %-ой концентрацией сахарозы и добавлением тех же микроэлементов в равной опыта концентрации.

3) Измерение размеров пыльцевых зерен и пыльцевых трубок проводили с использованием микроскопа БИОМЕД 5, микрофотосъемку с использованием цифровой камеры TOUPCAM FM A 050.

4) Размер пыльцевых зерен и пыльцевых трубок измеряется в микронах с использованием окуляр микрометра. В подсчет включается не менее 5 полей зрения, просматривается не менее 100 пыльцевых зерен;

5) Определение энергетической активности пыльцевых зерен и их жизнеспособности, оценка роста пыльцевых трубок. Определение энергетической активности (энергии прорастания) пыльцевых зерен проводили по методике Я. Г. Оголевец (1961) [9]. Энергия прорастания пыльцевых зерен соответствует величине, являющейся произведением процента прорастания пыльцы (жизнеспособность, %) за определенный срок на относительную длину пыльцевой трубы, выраженную в процентах к максимальной длине, полученной в опыте.

Жизнеспособность пыльцы соответствует числу проросших пыльцевых зерен по отношению к их общему числу, выраженному в процентах. Проросшими считали пыльцевые зерна с длиной пыльцевой трубы равной длине пыльцевого зерна в экваториальной проекции (диаметру) и более.

Для статистической обработки данных мы использовали свободную среду программирования R-studio, а для выявления внешних факторов влияния на скорость роста пыльцевых трубок – критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение.

Различными исследователями было подтверждено, что сахароза способствует увеличению интенсивности дыхания пыльцы и не может являться полноценной основой для определения энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен. Поэтому мы разработали более простой способ определения жизнеспособности пыльцы у различных видов кларкии, путем ее культивирования на среде, включающей раствор синтетического осмотически активного вещества – полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ. 6000) в концентрации 30 %, не участвующий в метаболизме растительной клетки, что позволяет определить энергетические возможности пыльцевых зерен и их жизнеспособность.

У исследованных видов кларкии секции *Godetia* и *Rhodanthos* отличались наличием разнопоровых (трех- и четырех-поровых) пыльцевых зерен. Самые крупные четырехпоровые пыльцевые зерна были отмечены у *C. purpurea* Лиловая фея из секции *Godetia*, экваториальный диаметр 84,8 мкм ± 6,5 мкм (min 76,2–max 95,7 мкм), самые мелкие трехпоровые в секции *Rhodanthos*, экваториальный диаметр варьировал от – 59,4 мкм ± 3,43 мкм (min 51,8 – max 64,7 мкм) у *C. amoena* subsp. *lindleyi* Персиковая чаша до 67,5 мкм ± 4,2 мкм (min 57,0– max 75,3 мкм) у *C. amoena* Малиновая чаша. Пыльцевые зерна *C. unguiculata* Коралловые рифы из секции *Phaeostoma* отличались звездчатой трехпоровой формой с экваториальным диаметром – 76,8 мкм ± 3,98 мкм (min 58,6–max 87,4 мкм). Пыльцевые зерна у изученных видов кларкии могут давать сразу несколько пыльцевых трубок (из каждой поры).

Результаты подтвердили, что при использовании среды с содержанием ПЭГ 6000 в концентрации 30 % – показатели скорости роста пыльцевой трубы, энергетической активности (энергии прорастания) и жизнеспособности пыльцевых зерен у представителей рода *Clarkia*, из трех различных секций значительно превышают эти же показатели, полученные на среде с использованием 15 %-ной сахарозы, как после 4-х часов, так и после 24-х часов культивирования (Табл. 1).

Таблица 1.

Энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен у видов и сортов *Clarkia Pursh*, в зависимости от времени культивирования и состава среды

Вид кларкии	Время, часы	*ПЭГ 6000 - 30 %			*Сахароза - 15 % (контроль)		
		**Энергия прорастания, %	Жизнеспособность, %	Длина ПТр, мкм	**Энергия прорастания, %	Жизнеспособность, %	Длина ПТр, мкм
Секция <i>Rhodanthos</i>							
<i>C. amoena</i> Малиновая чаша	4	29,5 ± 1,7	44,3 ± 3,4	90,8 ± 5,2	12,5 ± 1,9	19,4 ± 2,2	38,3 ± 5,9
	24	35,5 ± 4,5	59,4 ± 2,6	133,8 ± 16,1	25,1 ± 2,5	35,2 ± 1,3	63,2 ± 6,2
<i>C. amoena</i> <i>subsp. lindleyi</i> Персиковая чаша	4	19,4 ± 2,1	41,7 ± 2,3	75,3 ± 5,9	11,8 ± 0,9	19,1 ± 1,4	27,4 ± 2,0
	24	33,8 ± 3,5	54,3 ± 2,6	137,5 ± 14,0	17,4 ± 1,2	28,2 ± 1,4	35,9 ± 3,2
Секция <i>Godetia</i>							
<i>C. purpurea</i> Лиловая фея	4	43,9 ± 5,1	76,1 ± 4,9	113,4 ± 16,3	29,0 ± 2,6	38,9 ± 3,5	75,3 ± 6,8
	24	51,2 ± 4,7	87,9 ± 2,6	179,0 ± 33,9	29,1 ± 1,6	45,7 ± 2,5	99,4 ± 8,1
Секция <i>Phaeostoma</i>							
<i>C. unguiculata</i> Коралловые рифы	4	37,1 ± 3,2	47,2 ± 2,0	105,2 ± 14,5	20,8 ± 1,3	28,8 ± 3,3	72,2 ± 3,8
	24	38,7 ± 3,9	75,3 ± 4,2	134,1 ± 29,3	20,9 ± 3,4	41,3 ± 2,5	88,2 ± 18,6
Средние значения	4	32,5 ± 3,0	52,3 ± 3,1	96,2 ± 10,4	18,5 ± 1,7	26,5 ± 2,6	53,3 ± 4,6
	24	39,8 ± 4,2	69,2 ± 3,0	146,1 ± 23,3	23,1 ± 2,2	37,6 ± 1,9	71,7 ± 9,0

*Среда как с ПЭГ 6000, так и с сахарозой включала: борную кислоту Н3ВО3 – 0,01%, нитрат кальция Са (NO₃) – 0,03%, сульфат магния Mg SO₄ – 0,02%, нитрат калия KNO₃ – 0,01%.

** Энергетическая активность (энергия прорастания) пыльцевых зерен рассчитывалась по методике: Оголовец, 1961.

1) Секция *Rhodanthos*: у *C. amoena* сорта Малиновая чаша энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен была выше в 2,4–2,1 раза через 4-е часа культивирования и в 1,4–2,4 раза – через 24 часа, при этом длина пыльцевых трубок была выше в 2,4–2,1 раза соответственно, чем у контрольных вариантов, культивируемых на среде с сахарозой. У подвида *C. amoena* *subsp. lindleyi* сорта Персиковая чаша показатели энергетической активности и жизнеспособности пыльцы были выше в 1,7–2,0 раза через 4-е часа культивирования и в 2–1,9 раза через 24 часа культивирования соответственно, при этом длина пыльцевых трубок была выше в 2,7–3,8 раза, чем у контрольных вариантов;

2) Секция *Godetia*: у *C. purpurea* сорта Лиловая фея энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен через 4-е часа культивирования была выше в 1,5–2 раза, чем у контрольного варианта, а при увеличении времени культивирования до 24-х часов – в 1,8–1,9 раза, при этом длина пыльцевых трубок выше в 1,5–1,8 раза, соответственно.

3) Секция *Phaeostoma*: у *C. unguiculata* сорта Коралловые рифы энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен после 4-х часов культивирования была выше в 1,8–1,6 раза соответственно, а после 24-х часов культивирования энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен были выше в 1,8 раза, чем у контрольного варианта. Длина пыльцевых трубок была выше в 1,5 раза при всех сроках культивирования.

Средние значения энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен для всех представленных видов и подвида *Clarkia* из трех секций на среде с ПЭГ 6000 превышают показатели контроля в 1,8–2,0 раза через 4-е часа и в 1,7–1,8 раза через 24-е часа культивирования. Длина пыльцевых трубок на среде с ПЭГ 6000 после 4-х и 24-х часов культивирования больше в 1,8–2 раза соответственно, чем у контрольных вариантов

Анализ данных в среде программирования R-studio и кластерный анализ подтвердили, что на скорость роста пыльцевых трубок, энергию прорастания и жизнеспособность пыльцевых зерен у всех видов кларкии из трех различных секций достоверно влияют: состав среды культивирования (осмотик) (*p*-value = 2.557e⁻¹⁰), продолжительность времени культивирования

($p\text{-value} = 5.057e^{-09}$ ($5*10^{-9}$), виды и сорта кларкии ($p\text{-value} = 3.209 e^{-05}$) и не влияют условия года вегетации ($p\text{-value} = 0.3307$) (Рис. 1).

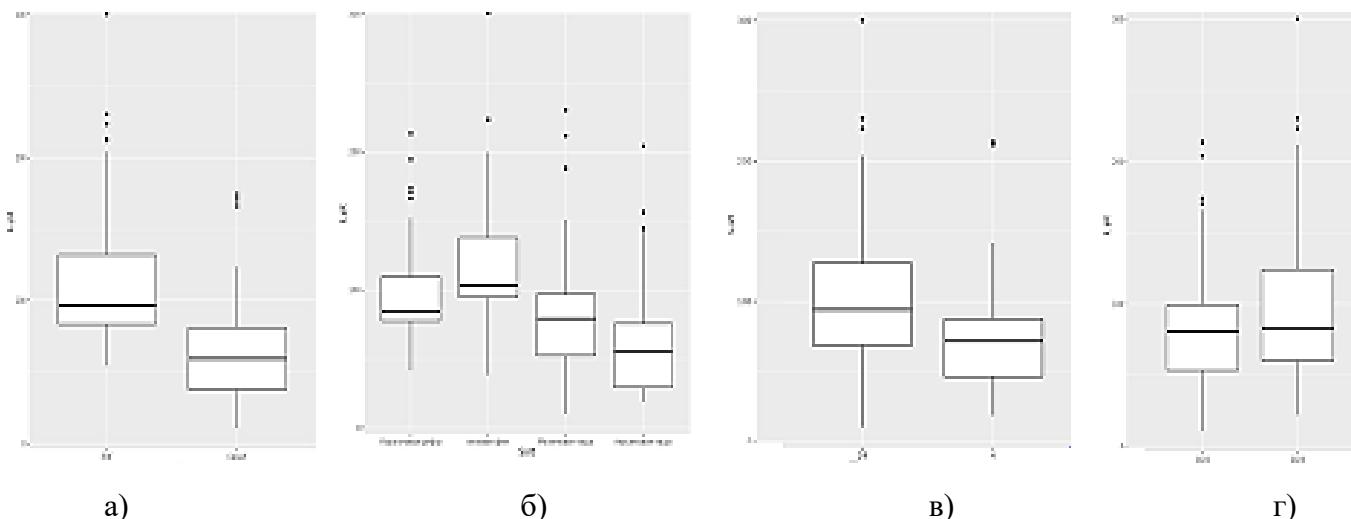


Рисунок 1. Влияние разных факторов на длину пыльцевой трубы у видов и сортов кларкии: а) состав среды культивирования (осмотик); б) виды и сорта кларкии; в) продолжительность времени культивирования; г) условия года исследования.

Таким образом, заявленный способ определения жизнеспособности пыльцы видов кларкии обладает преимуществом по сравнению с раствором сахарозы и может использоваться для сохранения и использования ресурсов зародышевой плазмы и селекции новых сортов декоративных культур рода *Clarkia*. На данный способ зарегистрирована заявка на патент (Заявка № 2024102029 от 28.01.2024).

Библиографический список

1. Flora of North America. URL: <http://dev.floranorthamerica.org/Clarkia>
2. Ottaviano, E., Sidoti, P., Villa, M. (1986). Pollen Competitive Ability in Maize Selection and Single Gene Analysis. In: Mulcahy, D.L., Mulcahy, G.B., Ottaviano, E. (eds) Biotechnology and Ecology of Pollen. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8622-3_4.
3. Фотев Ю. В. Оценка холодостойкости коллекционных образцов момордики (*Momordica charantia* L.) по прорастанию пыльцы при низкой температуре *in vitro*. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022;183(3):39-47. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-39-47
4. MacSwein J., Raven P., Thorp R. Comparative behavior of bees and Onagraceae. IV *Clarkia* of bees the western United States // Univ. of Calif. Publ. – 1973. – Vol. 70. – P. 1–80.
5. Hove AA, Mazer SJ. Pollen Performance in *Clarkia* Taxa with Contrasting Mating Systems: Implications for Male Gametophytic Evolution in Selfers and Outcrossers. Plants (Basel). 2013 Apr 24;2(2):248-78. doi: 10.3390/plants2020248. PMID: 27137375; PMCID: PMC4844357.
6. Голубинский И. Н. Биология прорастания пыльцы. Киев: Наукова думка, 1974. 368 с.
7. Brewbaker J.L., Kwack B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth // American Journal of Botany. 1963. V. 50, № 9. Р. 859–865.
8. Авторское свидетельство № 328885 А1 СССР, МПК A01G 7/00. Питательная среда для прорашивания пыльцы растений: № 1442720/30-15: заявл. 22.05.1970: опубл. 09.02.1972 / Н. Л. Кривко.
9. Оголевец Я. Г. О самостерильности Ирисов // Бюллетень ГБС. - Вып. 40, 1961.– С. 77–85.