

6. Вишнякова М.А., Булынец С.В., Бурляева М.О., Буравцева Т.В., Егорова Г.П., Семенова Е.В., Сеферова И.В. Исходный материал для селекции овощных бобовых культур в коллекции ВИР // Овощи России. – 2013. – № 1 (18) – С. 16-25.
7. Синюшин А.А. Селекция растений в эпоху факториальной концепции наследственности // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2015. – № 4. – С. 27-36.
8. Фадеева А.Н., Шурхаева К.Д., Фадеев Е.А., Абросимова Т.Н. Результаты и перспективы селекции гороха на устойчивость к раскрыванию бобов // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – № 5 – С. 20-22.
9. Характеристика сортов растений, впервые включенных в 2016 году в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию: официальное издание. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2016. – 50 с.
10. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность по гороху. Официальный бюллетень Госсортокмиссии. Вып. 10. – 1995. – С. 705-744.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
12. Макашева Р.Х. Горох. Культурная флора СССР. Зерновые бобовые культуры // Ленинград: Изд-во Колос, 1979. – IV.–Ч. 1. – 250 с.

NEW PEA VARIETIES KABAN: MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, THE STRUCTURAL FEATURES OF PERICARP

E. A. Fadeev, A. N. Fadeeva, D. A. Kapran*, K. D. Shurchaeva, T. N. Abrosimova

FGBNU «TATAR RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE»

* FGBOU VPO «ST.-PETERSBURG STATE UNIVERSITY»

Abstract: *New pea varieties Kaban from other varieties is different structure of the pericarp. Anatomic researches have established lack of a pergamant layer in endocarp and the presence of a relatively thin mesocarp. The presence of lignin in the bands observed only in the cells of the abdominal seam and midrib. Lack of parchment layer provides resistance pods of dehiscence and shattering seeds.*

Keywords: *Pisum sativum, variety, anatomy of pods, endocarp, resistance to shattering pods.*

УДК 635.656:581.143.5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ N6 В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ ГОРОХА

С. В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

ФГБНУ «ВНИИ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

E-mail: svbobkov@gmail.com

Проведено изучение каллусогенеза и регенерационного процесса в культуре изолированных пыльников гороха с использованием различных модификаций питательной среды N6. Иницированы разбухшие изнутри пыльники, зеленые морфогенные каллусы и получены растения-регенеранты. Создан оригинальный вариант питательной среды N6, обеспечивающий высокую эффективность регенерационного процесса.

Ключевые слова: горох, сорт, гибрид, питательная среда, пыльник, микроспора, каллусогенез, регенерация, спорофитное развитие, гаплоид.

В настоящее время в мировой науке отсутствуют надежные методы получения дигаплоидов гороха, которые можно применить в селекционном процессе [1, 2]. Научные исследования с целью получения гаплоидных растений проводятся преимущественно с использованием культуры *in vitro* изолированных пыльников и микроспор. Несмотря на то, что микроспоры гороха являются клетками, трудно поддающимися репрограммированию на спорофитный путь развития, в научной литературе есть данные о получении в культуре пыльников небольшого числа эмбриоидов и побегов-регенерантов [3]. В культуре изолированных микроспор были иницированы многоядерные синктиумы с интактной экиной [4] и получено небольшое число растений-регенерантов, которые были слабыми и не

выдерживали адаптацию к условиям почвенной культуры тепличного бокса [1]. Положительные результаты получены в опытах с использованием для репрограммирования микроспор последовательной обработки бутонов холодом (+4°C) и культур изолированных пыльников высокими температурами (+35°C и +38°C) [5]. Интересные данные получены при разработке важного элемента технологии получения гаплоидов гороха – стимулированию регенерационного процесса. Эмбриогенные каллусы, инициированные на среде в присутствии 2,4-Д регенерировали растения по пути морфогенеза побегов на средах в присутствии БАП и НУК [2]. Растения-регенеранты культуры пыльников имеют преимущественное происхождение из соматических клеток [6].

На современном этапе исследования андрогенеза у гороха основное внимание уделяется использованию классических стрессовых воздействий (тепло, холод, осмотический шок) и поиску новых (сонификация, электропорация) для репрограммирования микроспор на спорофитный (эмбриогенный) путь развития. Особое внимание уделяют разработке состава питательных сред, поддерживающих ранние этапы эмбриогенеза микроспор [2]. В опытах по инициированию андрогенеза в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха, как правило, используют ограниченный набор питательных сред - MSB, NLN, KM [7]. Для получения гаплоидных растений из микроспор злаковых культур наиболее эффективна среда N6 [8]. Эта среда была специально создана для поддержания спорофитного развития микроспор. Поэтому использование среды N6 в опытах по получению гаплоидных растений гороха является перспективным направлением исследований.

Цель настоящего исследования состояла в оценке потенциала питательной среды N6 для инициации морфогенного каллусогенеза и поддержания регенерационного процесса в культуре изолированных пыльников гороха.

Материал и методика

В опытах использовали пыльники гороха, взятые с растений сорта Орловчанин и гибридов F₂ К-23-00 (ЛЮ-203-94 × Tristar). Растения-доноры пыльников выращивали в тепличном боксе.

Для культивирования изолированных пыльников использовали 4 питательных среды Np4, Np41, Np5 и Np51, взяв за основу среду N6 [8] (табл. 1). Нераскрывшиеся бутоны гороха стерилизовали в течение 10 минут в 0,5 % растворе хлоргексидингликоконата натрия. На поверхность питательных сред высаживали изолированные пыльники на одноядерной стадии развития. Всего было высажено 480 пыльников, из их 270 сорта Орловчанин и 210 гибрида К-23-00.

Таблица 1

Питательные среды, используемые в эксперименте

Среда	Состав
<i>Каллусогенные среды</i>	
Np4	N6 с 40 г/л сахарозы, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л мио-инозитола, 2 мг/л НУК, 2 мг/л БАП, 6 г/л агара
Np41	N6 с 40 г/л сахарозы, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л мио-инозитола, 2 мг/л НУК, 2 мг/л БАП, 0,1 мг/л 2,4-Д, 6 г/л агара
Np5	N6 с 40 г/л сахарозы, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л мио-инозитола, 0,2 мг/л НУК, 0,2 мг/л БАП, 6 г/л агара
Np51	N6 с 40 г/л сахарозы, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л мио-инозитола, 0,2 мг/л НУК, 0,2 мг/л БАП, 0,1 мг/л 2,4-Д, 6 г/л агара
<i>Регенерационные среды</i>	
R1	MSB с 40 г/л сахарозы, 4 мг/л БАП, 1 мг/л НУК, 6 г/л агара
MSB0	MSB с 30 г/л сахарозы, 5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НУК, 6 г/л агара
MSB1	MSB с 40 г/л сахарозы, 5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НУК, 6 г/л агара
MSB2	MSB с 40 г/л сахарозы, 4 мг/л БАП, 1 мг/л НУК, 5 мг/л аденина, 6 г/л агара
MSB3	MSB с 40 г/л сахарозы, 4 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК, 10 мг/л аденина, 6 г/л агара
XN	N6 с 40 г/л сахарозы, 4 мг/л БАП, 1 мг/л НУК, 5 мг/л аденина, 6 г/л агара

Исследование эффективности регенерационного процесса проводили с использованием 4 питательных сред, основанных на протоколе среды MSB, включая контрольный вариант MSB0 [9], а также питательной среды XN с основой N6 [8] (табл. 1).

Зеленые микрокалусы, инициированные в культуре пыльников гибрида К-23-00, были первоначально помещены на среду R1. После инициации регенерационного процесса, основанного на сочетании морфогенеза побегов и пролиферации недифференцированной ткани (рис. 1), части регенерирующих каллусных тканей клона №1 переносили на среды MSB0, MSB1, MSB2, MSB3, XN (табл. 1). Эффективность регенерационного процесса оценивали по числу побегов с длиной как больше, так и меньше 1,5 см. Подсчет числа побегов-регенерантов проводили во время пересадок на свежие среды. По каждому варианту среды проводили не менее 6 пересадок через 4 недели культивирования тканей *in vitro*.

Изолированные пыльники и регенерирующие каллусные ткани гороха культивировали при 16 часовом световом дне и температуре 25°C. Для анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты и обсуждение

На агаризованных питательных средах, созданных на основе протокола среды N6, большая часть изолированных пыльников гороха приобретала темную окраску и в дальнейшем не проявляла пролиферативной активности. Однако в условиях среды Np41 (и ряда других каллусогенных сред N6) отмечено появление разбухших изнутри пыльников (рис. 1 а), что указывало на эмбриогенную активность микроспор [10]. Подобное явление ранее не наблюдалось на среде MSB и других питательных средах [2, 6]. В культуре изолированных пыльников гороха на всех вариантах каллусогенной среды N6 происходило формирование полупрозрачных неморфогенных и зеленых с морфогенным потенциалом каллусов (рис. 1 б).

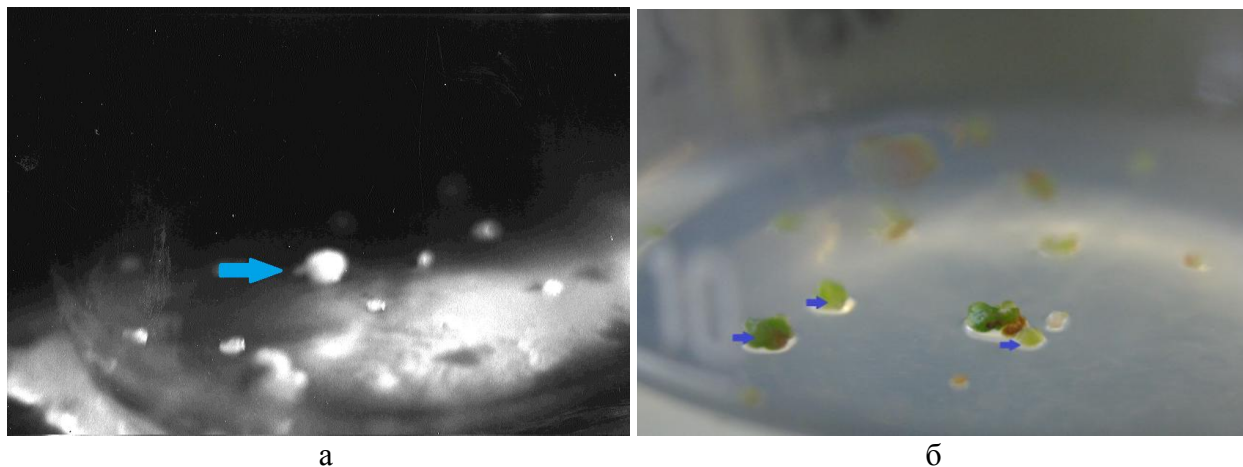


Рис. 1. Культура изолированных пыльников гороха на питательной среде Np41: а) набухший изнутри пыльник гороха (показано стрелкой); б) зеленые каллусы с морфогенным потенциалом (показаны стрелками)

Средняя частота формирования зеленых каллусов составила 3,8 % (табл. 2). Наибольшей эффективностью (5 %) каллусогенеза отличалась среда Np41. При этом у сорта Орловчанин из 60 высаженных пыльников не образовалось ни одного зеленого каллуса. Однако среди пыльников гибрида К-23-00 частота формирования зеленых каллусов составила 10 %. Значительное варьирование между генотипами частоты формирования зеленых каллусов также наблюдалось на среде Np51 (1,7 % у сорта Орловчанин и 6,7 % у гибрида К-23-00). Сильное варьирование по эффективности каллусогенеза наблюдалось на средах (Np41, Np51) с присутствием регулятора роста 2,4-Д.

Таблица 2

Эффективность формирования зеленых каллусов в культуре изолированных пыльников гороха.

Среда	Сорт, гибрид		Среднее значение
	Орловчанин	К-23-00	
Нр4	30 (3,3*)	90 (2,2)	2,8
Нр41	60 (0)	60 (10)	5
Нр5	60 (3,3)	30 (3,3)	3,3
Нр51	120 (1,7)	30 (6,7)	4.2

* число изолированных пыльников (% зеленых каллусов)

Зеленые каллусы 3-5 мм (рис. 1 б), сформированные на среде Нр1 и других каллусогенных средах, переносили на среду R1. В условиях этой среды в пролиферирующей каллусной ткани начинал функционировать процесс морфогенеза побегов, выражающийся в формировании зачатков побегов (рис. 2 а). Следует отметить, что регенерация побегов на среде R1 с сочетанием процессов пролиферации недифференцированной ткани и морфогенеза побегов продолжалась в течение длительного периода времени. Морфогенез побегов на среде R1 в каллусных тканях, инициированных на средах N6, свидетельствовал о хорошей совместимости указанных питательных сред.

Части тканей клона № 1 гибрида К-23-00 с регенерирующими побегами для исследования эффективности регенерационного процесса со среды R1 переносили на среды MSB0 (контроль), MSB1, MSB2, MSB3, XN (табл. 1). MSB0 (MS с витаминами среды B5) представляла среду, созданную Мирославом Григой с коллегами для микроразмножения гороха [9]. Увеличение концентрации сахарозы в среде MSB1 до 40 г/л в сравнении со средой MSB0 приводило к существенному уменьшению общего числа побегов, а также побегов с длиной больше и меньше 1,5 см (табл. 2). Добавление в среду MSB2 5 мг/л аденина на фоне уменьшенной концентрации БАП (4 мг/л) и увеличенной НУК (1 мг/л) не приводило к существенному увеличению числа побегов-регенерантов. Дальнейшее увеличение содержания аденина в среде MSB3 приводило к формированию многочисленных коротких побегов с длиной стебля до 3 мм и расширенным основанием в форме луковицы. Замена основы (соли, витамины) среды MSB2 на соответствующие компоненты N6 с сохранением уровня БАП, НУК, и аденина приводило к существенному увеличению числа побегов-регенерантов на среде XN в сравнении с контролем (табл. 3). По общему числу побегов, а также по числу побегов с длиной больше и меньше 1,5 см среда XN оказалась лучшей среди указанного набора испытываемых сред.

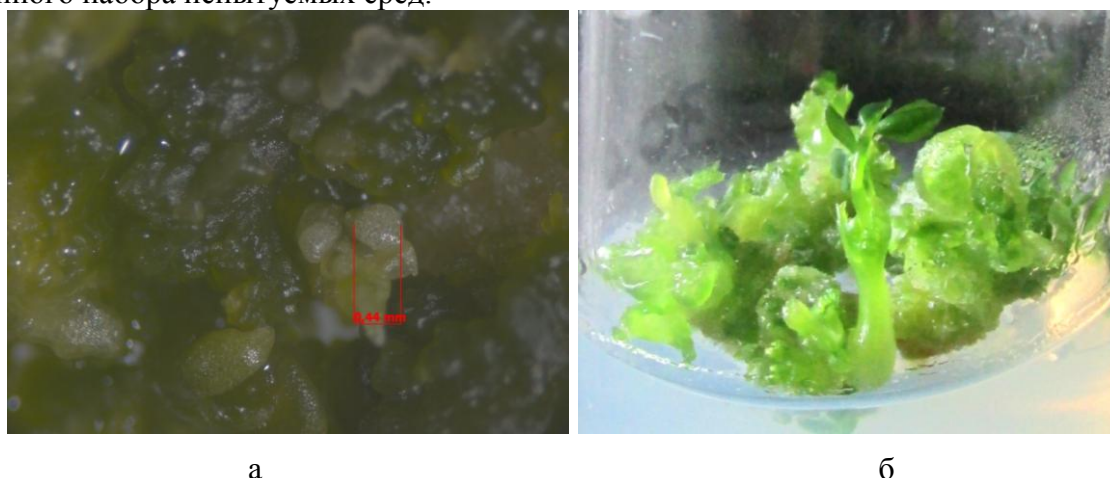


Рис. 2. Регенерационный процесс в морфогенных каллусных тканях на питательной среде R1: а) пролиферирующая ткань с зачатками побегов, б) побеги-регенеранты

Таблица 3

**Эффективность морфогенеза в каллусной культуре
клона №1 гибрида F₂ К-23-00 (ЛЮ-203-94 × Tristar)**

Среда	Число побегов в одном стаканчике	Число побегов с длиной стебля	
		< 1,5 см	>1,5 см
MSB0 (контроль)	10,3	9,3	1,0
MSB1	6,3*	5,3*	1,0
MSB2	8,6	7,4	1,2
MSB3	Многочисленные побеги с длиной стебля до 3 мм и расширенным основанием в форме луковицы		
XN	16,0*	12,9*	3,1*
HCP ₀₅	3,9	3,4	1,8

* обозначены статистически значимые различия между вариантами сред

Таким образом, различные модификации питательной среды N6 проявляли выраженную каллусогенную активность в культуре изолированных пыльников гороха, а также обеспечивали высокую эффективность регенерации побегов в течение длительного периода времени. Впервые в культуре изолированных пыльников гороха в условиях питательной среды Np41 зафиксировано появление разбухших изнутри пыльников, что свидетельствовало о возможном формировании эмбриоидов из микроспор.

Закключение

Проведено изучение каллусогенных и регенерационных питательных сред, созданных на основе протокола среды N6, в культуре изолированных пыльников гороха. Формирование зеленых морфогенных каллусов происходило на всех каллусогенных средах. На питательной среде Np41 (модификация среды N6) впервые зафиксировано появление разбухших изнутри пыльников, что свидетельствовало о возможном формировании эмбриоидов из микроспор. Среда N6 оказалась лучшей базовой основой среди исследованного набора сред по эффективности регенерационного процесса.

Автор выражают благодарность В.Н. Уварову за любезно предоставленный селекционный материал.

Литература

1. Ochatt S., Pech C., Grewal R., Coreux C., Lulsdorf M., Jacas L. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (*Fabaceae*) // Journal of plant physiology. - 2009. - V. 166. - P. 1314-1328.
2. Bobkov S. Obtaining calli and regenerated plants in anther cultures of pea // Czech journal of genetics and plant breeding. – 2014. – V. 50 (2). – P. 123-129.
3. Sidhu R., Davies P. Pea anther culture: callus initiation and production of haploid plants // Proceedings of the Australian Branch of the IAPT&B, Perth, Western Australia, 21-24th September, 2005. - P.180-186.
4. Croser J., Lulsdorf M., Davies P., Wilson J., Sidhu P., Grewal R., Allen K., Dament T., Warkentin T., Vandenberg A., Siddique K. Haploid embryogenesis from chickpea & field pea – progress towards a routine protocol // «Contributing to a Sustainable Future» I.J. Bennett, E. Bunn, H. Clarke, J.A. McComb (Eds.). Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B, Perth, Western Australia, 21-24th September, 2005. – P. 71-82.
5. Бобков С.В. Эмбриоиды и растения-регенеранты в культуре изолированных пыльников гороха (*Pisum sativum* L.) // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2012. - № 4. - С. 74-83.
6. Бобков С.В. Культура изолированных пыльников гороха // Доклады РАСХН. - 2010. - № 6. - С. 19-21.
7. Бобков С.В. Репрограммирование изолированных микроспор гороха на эмбриогенный путь развития // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2013. - № 5. - С. 5-10.
8. Chu C. The N6 medium and its applications to anther culture cereal crops // Proceedings of Symposium on plant tissue culture. – Peking: Science press, 1980. –P. 43-50.
9. Criga M., Tejcklova E., Novak F.J., Kubalakova M. In vitro clonal propagation of *Pisum sativum* L. // Plant tissue organ culture. - 1986. - V. 6. – P. 95-104.

10.Бобков С.В., Уваров В.Н. Каллусогенез и регенерация растений в культуре пыльников гороха // Достижения науки и техники АПК. - 2004. - № 2. - С.2-3.

APPLICATION OF N6-BASED NUTRIENT MEDIA IN CULTURE OF PEA ISOLATED ANTHERS

S. V. Bobkov

FGBNU «THE ALL-RUSSIA RESEARCH INSTITUTE OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

Abstract: Application of N6-based nutrient media in culture of pea isolated anthers was studied. On this media swollen anthers, green morphogenic calli and regenerated plant were produced. Original variant of N6-based medium with high efficiency maintained plant regeneration for a long time.

Keywords: pea, variety, hybrid, nutrient medium, anther, microspore, callogenesis, regeneration, sporophytic development, haploid.

УДК.635.656:631.584:631.527

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ ДИМОРФНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СОРТОВ ГОРОХА

А. А. ЗЕЛЕНОВ, научный сотрудник,

А. Н. ЗЕЛЕНОВ, Н. Е. НОВИКОВА*, доктора сельскохозяйственных наук

ФГБНУ «ВНИИ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

*ФГБОУ ВО «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ

УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н. В. ПАРАХИНА»

E-mail: Zelenov-a-a@yandex.ru

Одновидовые сортосмеси на зерно в большей степени чем монокультура утилизируют солнечную энергию. В лучших вариантах урожайность семян в смешанных посевах почти на 20 % превышает монопосев. Целесообразно создавать специальные гетероморфные синтетические сорта, и весь селекционный процесс осуществлять в условиях смешанного агроценоза, компонентами которых могут быть усатые, рассечённолисточковые, многократно непарноперистые формы гороха. Сформулированы принципиальные особенности фитоценотической селекции сортов-синтетиков и предложены методы её проведения.

Ключевые слова: горох, смешанные посевы, селекция, морфотипы, синтетические сорта, урожайность, монопосев.

Лауреат Нобелевской премии Н. Борлоуг (2001) очередным этапом зелёной революции определил теорию и практику смешанных посевов. Мысль о преимуществах возделывания многовидовых сообществ растений была высказана ещё Ч. Дарвиным. «Чем разнообразнее население [ценоза], тем оно может быть многочисленнее. Это подтверждает статистика любого клочка луга, любой пришлоей флоры, завоёвывающей себе новые места в природе» (К.А. Тимирязев, 1910).

Экспериментальное доказательство целесообразности использования поликультур в 1929-1934 гг. выполнил советский биолог Г.Ф. Гаузе на двух видах простейших – *Paramecium bursaria* и *Paramecium caudatum*, экологические ниши которых частично перекрываются. В пробирке, где сосуществовали оба вида, их суммарная численность была выше, чем численность каждого из видов при одиночном содержании. Благодаря этим опытам позднее был сделан вывод о том, что «монокультура экологически наименее эффективный способ наращивания биомассы, иными словами, монокультура – наименее эффективный способ ведения сельского хозяйства» (Н.В. Воронцов, 1999). Под