

result of the action of the recessive gene *af*, leads to an increase in the photophilicity of plants. In varieties with a tendriling leaf shape, with an increase in illumination from 300 to 1700 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$, the rate of photosynthesis of stipules increased almost 2-fold - from 6,5 to 12,8 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{m}^2\text{s}$, whereas in varieties with a traditional plant morphotype, with the same lighting conditions, the rate of photosynthesis increased by only 79%, and in the morphotype "chameleon" - 62%.

In this case, the nature of the dynamics of the rate of photosynthesis of the leaves did not change significantly when the lighting conditions changed, and the differences between the morphotypes were noted only in terms of the absolute value of its manifestation, that is, according to the reaction rate. With an increase in insolation from 300 to 1000 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$, the rate of photosynthesis in leaf varieties increased 1,8-fold, tendriling – 1,9 times, and chameleon – 2-fold. With further increase in illumination, the rate of photosynthesis in the leafy morphotype was decreased by 11%, in the chameleon by 19%, while in the varieties with the tendriling form of the leaf, the value of this indicator continued to grow - on average by 10%. That is, light saturation in genotypes of peas with a traditional morphotype occurs at a lower insolation, in comparison with tendriling varieties. This confirms the conclusion that the photosynthetic apparatus of the tendriling varieties is more responsive to an increase in intensity of light than in ordinary leaf varieties.

Keywords: breeding, agricultural crops, pea, variety, rate of photosynthesis, gene pool.

DOI: 10.24411/2309-348X-2018-11043

УДК 57.085.23

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

С.В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

ФГБНУ «ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

E-mail: svbobkov@gmail.com

Проведен анализ современного состояния в области получения андрогенных гаплоидов гороха. Выявлены критические элементы создаваемого метода и приведены результаты наших исследований. В культуре изолированных пыльников гороха инициировано развитие многоклеточных структур, морфогенных, эмбриогенных каллусов и растений-регенерантов. Из микроспор культивируемого *in vitro* пыльника получено несколько растений-регенерантов, что было подтверждено с использованием морфологических маркеров. В культуре изолированных микроспор обнаружены признаки перехода микроспор на спорофитный (эмбриогенный) путь развития и получены многоклеточные структуры. Показано, что перенос эмбриогенных каллусных тканей на питательные среды, традиционно используемые для морфогенеза побегов, способствует их переходу от эмбриогенного развития к формированию морфогенного потенциала, необходимого для быстрого и массового получения побегов-регенерантов. Проведен сравнительный анализ влияния 5 вариантов температурного стресса на формирование эмбриогенных каллусных тканей. Установлено, что обработка изолированных бутонов гороха низкой температурой +4°C в течение 7 суток является лучшим вариантом температурного стресса для стимулирования спорофитного развития микроспор. Показано, что оригинальные питательные среды с низким содержанием сахарозы более эффективно поддерживают инициацию эмбриогенных каллусов и эмбриоидов. Полученные результаты могут служить основой для разработки эффективных методов получения гаплоидных растений гороха.

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

Методы классической селекции позволяют достигать достаточно высокого уровня гомозиготности (99,2 %) только после длительного периода самоопыления (7 генераций). Гомозиготные по всем локусам линии гороха можно получить в течение 2 генераций с использованием андрогенеза в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха. Селекционная работа часто требует объединения в одном генотипе нескольких ценных аллелей, расположенных в различных локусах. Это приводит к необходимости проведения отбора генотипов с сочетанием аллелей в расщепляющихся популяциях больших размеров. Использование гаплоидии в селекции растений позволяет значительно снизить размер популяции для отбора растений гомозиготных по нескольким локусам.

Разработка методов получения гаплоидов перспективна для генетических и физиологических исследований, а использование гаплоидных растений для создания новых сортов гороха позволит повысить эффективность селекционного процесса за счет существенной экономии времени и материальных ресурсов. Получение гаплоидных растений из микроспор (андрогенез) является приоритетным направлением исследований для многих сельскохозяйственных культур. В настоящее время методы получения гаплоидов доступны для ограниченного числа видов сельскохозяйственных растений. Горох не входит в перечень культур, для которых разработаны надежные методы и технологии получения гаплоидных растений [1, 2].

Цель работы состояла в анализе современного состояния исследования андрогенеза гороха и получении новых знаний, важных для разработки эффективных методов получения гаплоидных растений гороха в условиях питательных сред культуры *in vitro*.

Материал и методика

В опытах использовали пыльники, взятые с широкого набора сортов и гибридов гороха. Растения-доноры пыльников выращивали в полевых условиях.

Для культивирования изолированных пыльников применяли различные питательные среды с широким набором регуляторов роста, витаминов, антиоксидантов, сахаров, глутамина и гидролизата казеина. Для получения морфогенных каллусов использовали питательные среды с содержанием НУК и БАП. Стимулирование эмбриогенного развития микроспор в культуре изолированных пыльников проводили на средах с 2,4-Д. В культуре изолированных микроспор применяли 2,4-Д в сочетании с другими регуляторами роста.

Исследования проводили с использованием микроскопов Axioskop 40 и Stemi 2000 (KARL ZEISS, Германия). Стадию развития микроспор и их жизнеспособность определяли путем окрашивания пыльников в 4% ацетокармине. Для репрограммирования на спорофитный путь развития использовали микроспоры на одноядерных стадиях развития (рис. 1 а и б).

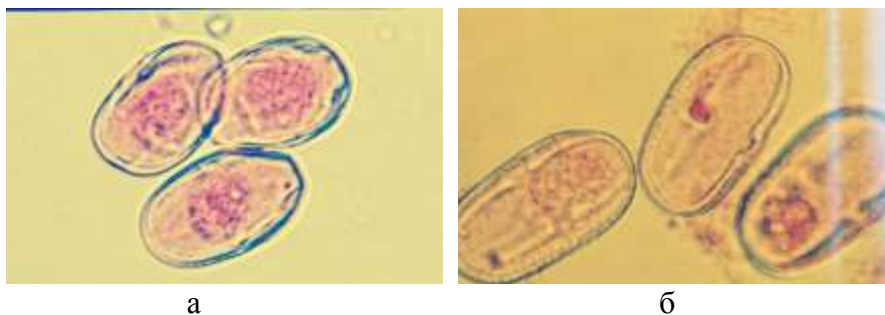


Рис. 1. Микроспоры гороха на ранней (а) и поздней вакуолизированной одноядерной (б) стадии развития

Применяли биотехнологические методы работы с изолированными пыльниками и микроспорами гороха в оригинальной модификации [3]. Бутоны стерилизовали с использованием 70% этилового спирта и 0,5% раствора хлоргексидингликоконата натрия в

дистиллированной воде. Пыльники промывали дистиллированной водой и высушивали на стерильной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Пыльники из бутонов изолировали с помощью тонкого пинцета и помещали на поверхность агаризованных питательных сред. Для получения культуры изолированных микроспор стерильные бутоны гороха гомогенизировали в фарфоровой ступке в 2-3 мл среды В, содержащей 0,3 М маннитола. Изолированные микроспоры культивировали в стаканчиках на стационарной поверхности с плотностью 105 микроспор/мл.

В опыте по изучению влияния температурного стресса на эффективность инициации эмбриогенных каллусов оценивали питательные среды, содержащие 2,4-Д (mp2, mbd, mmd2, pa74, msf1, pa53, nb1, Nap, mmd1), ИУК (mmi) и не содержащие регуляторов роста (mb2). Изолированные бутоны подвергали обработке холодом (+4°C) в течение 7 суток, а изолированные пыльники в условиях питательных сред – высокой температурой (32°C и 33°C) в течение 1 суток. Обработку изолированных пыльников при 35°C и 38°C проводили в течение 18 часов. Всего на питательные среды было высажено 1440 пыльников. Изолированные пыльники и регенерирующие каллусные ткани гороха культивировали при 16 часовом световом дне и температуре 25°C.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием дисперсионного анализа, а значимость различий между средними значениями в вариантах опыта определяли по критерию НСР05.

Результаты и обсуждение

Исследования гаплоидии в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха на современном этапе характеризуются выраженной поисковой составляющей. Они направлены на испытание широкого набора критических факторов (генотип, питательная среда, регуляторы роста, стрессовые воздействия и др.) для репрограммирования микроспор на спорофитный путь развития и идентификацию удачных вариантов. Проведенная исследовательская работа по репрограммированию микроспор гороха на спорофитный путь развития вселила надежду на возможность разработки эффективного метода получения гаплоидов гороха [4]. В культуре изолированных пыльников в условиях модифицированной среды N6 наблюдали появление разбухших изнутри пыльников, что является признаком формирования эмбриоидов из репрограммированных микроспор [5, 6]. Проточная цитометрия подтвердила наличие андрогенеза в пролиферирующих тканях в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха при последовательном применении таких стрессовых воздействий, как холод, электропорация и осмотический шок [7]. Исследователи международного коллектива ученых из Австралии и Канады наблюдали симметричное деление одноядерных изолированных микроспор гороха с последующим развитием в многоклеточные синктиумы, что рассматривается в качестве надежного признака перехода микроспор на эмбриогенный путь развития [8]. В наших исследованиях в культуре изолированных микроспор гороха иницированы многочисленные микрокалусы (эмбриоиды) [9]. В экспериментах с сочетанием различных стрессов группой ученых INRA (Dijon, France) и Саскачеванского университета (Saskatoon, Canada) в культуре изолированных микроспор гороха получено небольшое число гаплоидных растений-регенерантов [1, 10]. В наших исследованиях культуры изолированных пыльников гороха получены несколько растений-регенерантов, происходящих из микроспор культивируемого *in vitro* пыльника, что было показано с использованием морфологических маркеров [2, 4]. Достигнутые результаты могут служить основой для дальнейших исследований с целью разработки методов получения жизнеспособных гаплоидных эмбриоидов и растений-регенерантов гороха.

Морфогенный и эмбриогенный каллусогенез в культуре пыльников, культура изолированных микроспор гороха – различные подходы для репрограммирования микроспор гороха на спорофитный путь развития

Андрогенные гаплоиды получают в культурах *in vitro* изолированных пыльников и микроспор. В культуре пыльников гороха разработаны несколько подходов для инициации андрогенного развития микроспор. Применение регуляторов роста НУК и БАП приводит к формированию морфогенных каллусных тканей.

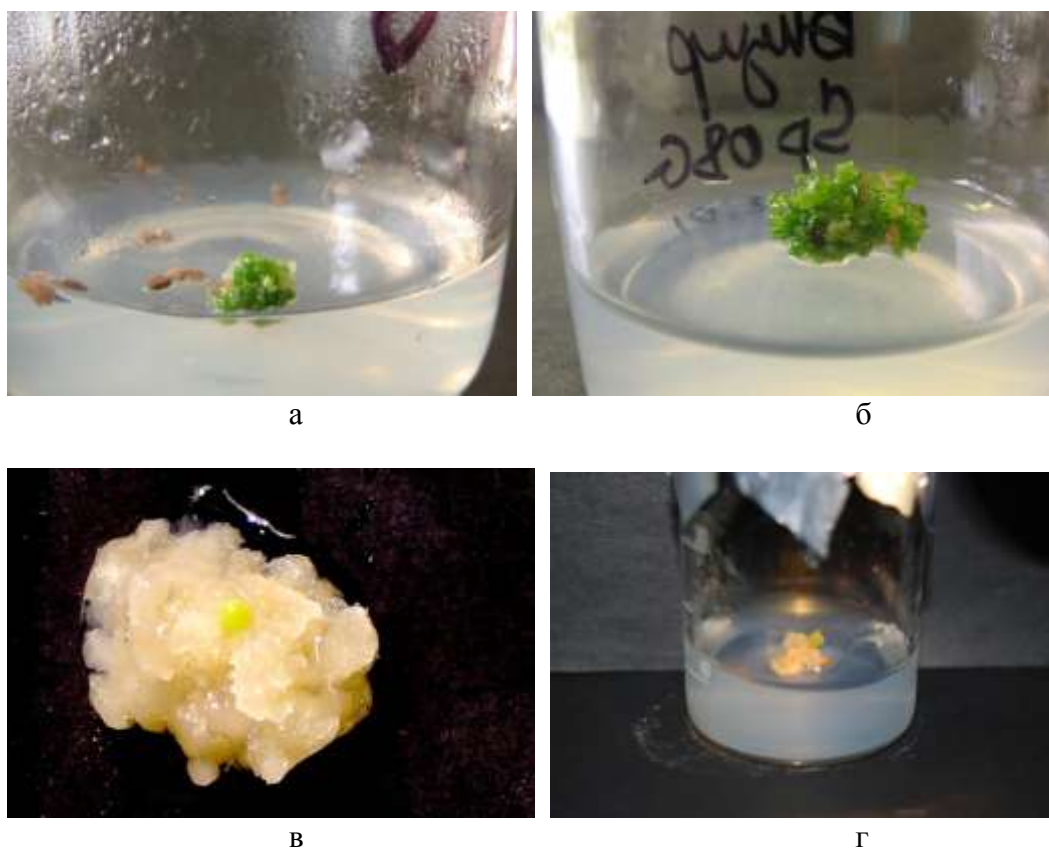


Рис. 2. Эмбриогенный каллусогенез в культуре *in vitro* изолированных пыльников гороха: инициация зеленого эмбриогенного каллуса (а), зеленая эмбриогенная каллусная ткань (б), эмбриониды на стадиях глобулы (в) и торпеды (г)

Получение морфогенных каллусов в культуре изолированных пыльников гороха сопровождается пролиферацией соматических тканей, а растения-регенеранты имеют преимущественное происхождение из соматических клеток [4]. Для уменьшения эффекта нежелательной пролиферации соматических клеток пыльников иницируют эмбриогенные каллусные ткани на питательных средах, содержащих регулятор роста 2,4-Д (рис. 2 а, б, в, г).

Другим перспективным методом, используемым для получения гаплоидных растений гороха, является культура изолированных микроспор. В культуре изолированных микроспор гороха определены сочетания стрессовых воздействий и составов питательных сред, приводящие к переводу микроспор гороха на спорофитный (эмбриогенный) путь развития. Показано, что на ранних этапах развития эмбриогенные микроспоры гороха приобретают округлую форму, ядро перемещается к центру клетки, увеличивается интенсивность окрашивания цитоплазмы (рис. 3 а). Отдельные эмбриогенные микроспоры характеризуются выпячиванием микропласта через поры за пределы экзины. В результате спорофитного репрограммирования изолированных микроспор гороха получены микрокаллусы (эмбриониды) в оригинальных жидких питательных средах [9].

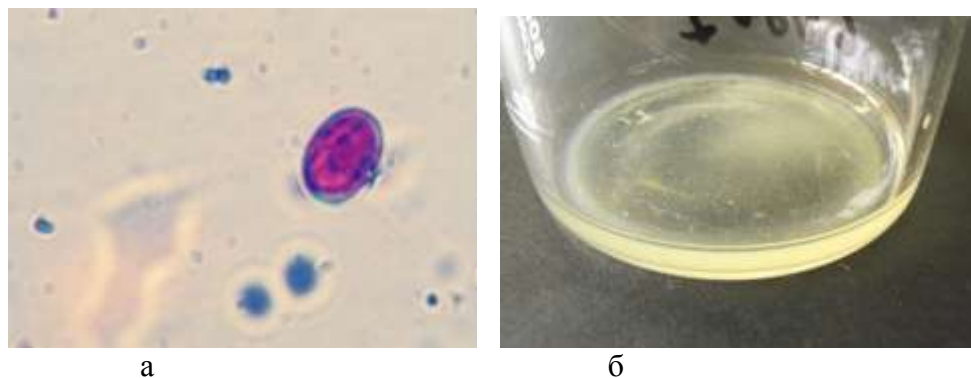


Рис. 3. Культура изолированных микроспор гороха: эмбриогенная микроспора с густой цитоплазмой и центральным положением конденсированного ядра (а), микрокалусы (эмбриониды) 0,5-1 мм в жидкой питательной среде (б)

Регенерационный процесс в культурах эмбриогенных каллусных тканей гороха

Стимулирование регенерационного процесса в культуре морфогенных каллусных тканей и массовое получение побегов-регенерантов происходит в условиях питательных сред с высокой концентрацией БАП и низкой НУК [11]. Создание питательных сред для стимулирования и поддержания регенерационного процесса возможно на основе питательных сред MSB и N6, при этом в одном из наших опытов модифицированная среда N6 оказалась лучшей по эффективности регенерационного процесса [6].

Мирослав Грига показал, что регенерация соматических эмбрионидов, полученных из апикальных меристем гороха с использованием пиклорама, на среде с высокой концентрацией тидиазурина происходит по пути морфогенеза побегов [12]. В наших опытах эмбриогенные каллусы, полученные из изолированных пыльников на средах с 2,4-Д и перенесенные на среды для стимулирования регенерационного процесса перестраивались с эмбриогенного на морфогенный путь развития [2, 4]. Например, в культуре эмбриогенных каллусов на питательной среде MSB с 4 мг/л БАП и 1 мг/л НУК вначале происходила пролиферация каллусной массы, а затем наблюдались геммогенез (рис. 4 а) и регенерация (морфогенез) побегов (рис. 4 б). Установлено, что наиболее успешно регенерирующими тканями являются зеленые эмбриогенные каллусы (рис. 2 а и б), полученные в результате обработки бутонов холодом (+4°C) и последующего воздействия высокой температурой (+35°C-+38°C) [13].



Рис. 4. Геммогенез в пролиферирующей каллусной ткани (а) и регенерация побега (б)

Стимулирование регенерационного процесса у зеленых эмбриогенных каллусов сопровождалось появлением гипертрофированных эмбрионидов и побегов, что являлось признаком перехода эмбриогенных каллусных тканей на путь пролиферации компетентных к морфогенезу клеток и регенерации побегов. В нашем опыте регенерирующие каллусные

ткани, полученные из зеленых эмбриогенных каллусов в культуре пыльников сорта Визир в вариантах стрессовых обработок: в) холод 3 суток, тепло +35°C 18 часов и г) холод 4 суток, тепло +35°C 18 часов на среде MSB, дополненной 0,5 мг/л 2,4-Д, наряду с геммогенезом (рис. 4 а и 5 а, б, в) характеризовались наличием гипертрофированных эмбриоидов на стадиях глобулы (рис. 5 а), сердца (рис. 5 б) и торпеды (рис. 5 в), а также гипертрофированных побегов (рис. 5 г) [2, 4, 13].

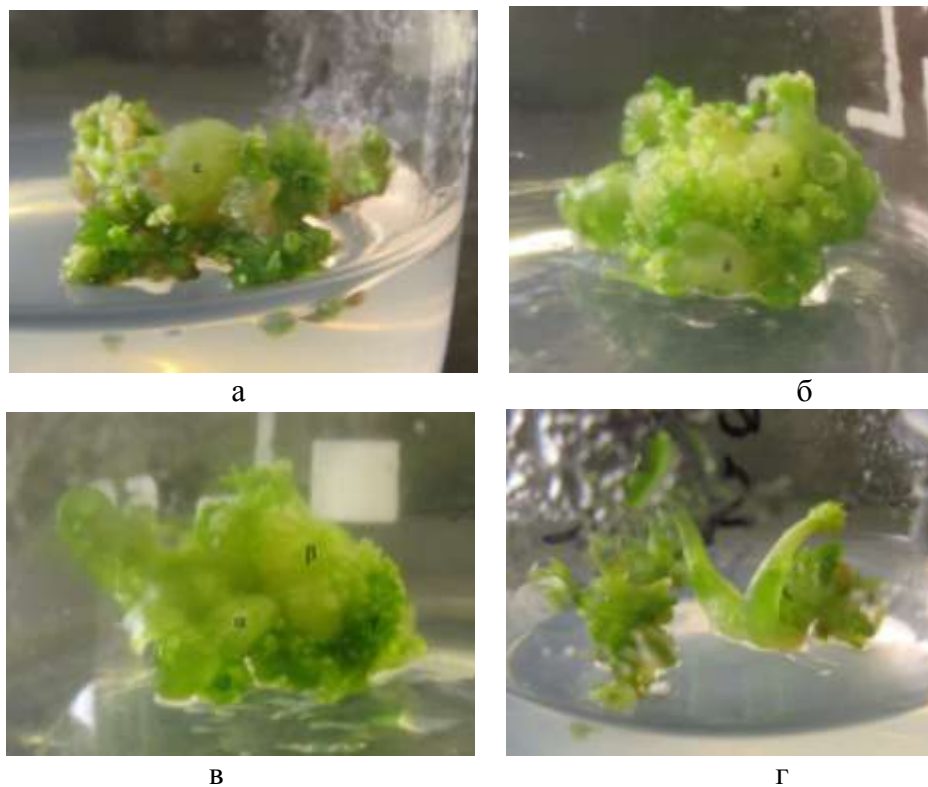


Рис. 5. Стимулирование регенерационного процесса в культуре зеленых эмбриогенных калусных тканей: гипертрофированные эмбриоиды на стадиях глобулы (а), сердца (б) и торпеды (в), регенерация гипертрофированных побегов (г). Буквами греческого алфавита обозначены: α – эмбриоид на стадии торпеды, β – гипертрофированный эмбриоид на стадии торпеды, γ – геммогенез в пролиферирующей калусной ткани, δ – гипертрофированные эмбриоиды на стадии сердца, ϵ – гипертрофированный эмбриоид на стадии глобулы

Проведенные исследования показали, что регенерация растений гороха в эмбриогенных калусных тканях на средах для морфогенеза побегов возможна за счет вторичной пролиферации эмбриогенных клеток и последующего запуска процесса геммогенеза, создающих потенциал для морфогенеза побегов и массового получения растений-регенерантов. Для успешной регенерации растений необходимы эмбриогенные каллусы, полученные с использованием определенных режимов температурного стресса.

Влияние стрессовых воздействий на эффективность каллусогенеза в культуре изолированных пыльников гороха

В исследованиях, направленных на репрограммирование изолированных микроспор гороха на спорофитный (эмбриогенный) путь развития, используют стрессовые воздействия теплом, холодом, осмотическим шоком, применяют углеводное голодание, сонификацию и электропорацию [1, 2]. В опытах Sergio Ochatt с соавторами обработка изолированных бутонов гороха холодом (+4°C) в течение 48 и более часов приводила к увеличению числа микрокаллусов в культуре изолированных микроспор [1]. Положительное влияние обработки

изолированных бутонов холодом (+4°C) на эмбриогенный каллусогенез в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха нашло подтверждение и в наших экспериментах [4, 9]. В научной литературе приведены данные о положительном влиянии на андрогенез последовательного применения таких стрессовых воздействий, как холод, электропорация и осмотический шок в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха [1, 7].

1. Применение высоких температур в качестве стрессового воздействия не нашло широкого применения в экспериментах зарубежных коллег по гаплоидии гороха, только в одной работе было заявлено о признаках формирования каллусов в культуре изолированных пыльников гороха, подвергнутых воздействию температурой 37°C [14]. В наших экспериментах показано положительное влияние обработки изолированных пыльников повышенными температурами на инициацию каллусных тканей [2, 4]. Следует отметить важность для репрограммирования микроспор последовательной обработки бутонов холодом (+4°C) и культур изолированных пыльников высокими температурами (+35°C и +38°C), что в итоге приводит к увеличению регенерационного потенциала эмбриогенных каллусных тканей [2].

2. Для более ясного понимания влияния температурного стресса на эффективность инициации эмбриогенных каллусов проведено изучение 5 температурных режимов с использованием 11 питательных сред. В опыте на микроспоры воздействовали пониженной и повышенной температурами +4°C, +32°C, +33°C, +35°C, +38°C. Обработку холодом (+4°C) применяли к изолированным бутонам, а высокой температурой воздействовали на изолированные пыльники в условиях культуры *in vitro*. Учитывали только эмбриогенные каллусы.

В вариантах опыта число иницированных эмбриогенных каллусов варьировало от 0,3 до 4,2% при среднем значении 1,5% (табл. 1). Выявлена явная тенденция снижения эффективности каллусогенеза с ростом температуры стрессовых воздействий. Если при обработке теплом 32°C эффективность каллусогенеза равнялась 1,8%, то повышение температуры обработок до 38°C (при сниженном на 30% времени воздействия) приводило к уменьшению эффективности инициации эмбриогенных каллусов до 0,3%. Эффективность каллусогенеза при обработке бутонов низкой температурой +4°C в течение 7 суток составила 4,2%, что существенно превышало все варианты обработок пыльников повышенными температурами. Статистически значимых различий между вариантами обработок повышенными температурами не обнаружено.

Таблица 1

Влияние температурного стресса на эффективность формирования эмбриогенных каллусов в культуре пыльников гороха

Температурный режим	Высажено пыльников	% эмбриогенных каллусов
4°C	180	4,2 ^{a*}
32°C	360	1,8 ^b
33°C	660	0,9 ^b
35°C	150	0,8 ^b
38°C	90	0,3 ^{b33}
ВСЕГО	1440	1,5

* значимость различий между средними значениями в вариантах опыта определяли по критерию HSP_{05} , наличие в таблице различных индексов *a* и *b* между вариантами опыта указывает на существенность различий

Из 11 питательных сред, использованных в опыте, 4 были созданы на основе среды N6, а 7 – среды MSB. Питательные среды mp2, mbd, mmd2, na74, msf1, na53, nb1, Nap, mmd1 в

качестве регулятора роста содержали 2,4-Д, среда mmi – ИУК, а среда mb2 не содержала регуляторов роста (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность инициации эмбриогенных каллусов на питательных средах различного состава

Среда	Минеральная основа сред (соли и витамины)	Высажено пыльников	% эмбриогенных каллусов
mp2	MSB	90	0,3 ^{ab*}
mb2	MSB	150	0,4 ^a
mbd	MSB	120	0,5 ^a
mmd2	MSB	120	0,8 ^{abc}
na74	N6	180	0,8 ^{ab}
msf1	MSB	120	1 ^{abc}
na53	N6	60	1 ^{abc}
nb1	N6	120	1 ^{abc}
mmi	MSB	180	1,8 ^{abc}
Nap	N6	150	3,6 ^{bc}
mmd1	MSB	150	3,8 ^c
ВСЕГО		1440	1,5

* значимость различий между средними значениями в вариантах опыта определяли по критерию НСР₀₅, полиморфизм по всем индексам (abc) указывает на существенность различий между средними значениями

Эффективность каллусогенеза в зависимости от среды варьировала от 0,3 до 3,8%. Наибольшую эффективность в инициации эмбриогенных каллусов продемонстрировали питательные среды Nap (3,6%) и mmd1 (3,8%). На питательных средах mmd2 и mp2 несмотря на относительно низкую эффективность каллусогенеза формировались глобулярные эмбриоиды. Следует заметить, что характерной особенностью состава питательных сред Nap, mmd1, mmd2, mp2 являлось низкое содержание сахарозы.

Заключение

Инициация тотипотентных клеток с потенциалом эмбриогенного развития, а также микрокаллусов, эмбриоидов, морфогенных и эмбриогенных каллусных тканей, стимулирование регенерационного процесса являются критическими факторами, определяющими получение гаплоидных растений в культурах изолированных пыльников и микроспор гороха. В наших исследованиях выявлены физиологические факторы, определяющие спорофитное развитие микроспор, а также формирование эмбриоидов и каллусных тканей. В культуре изолированных пыльников гороха иницированы многоклеточные структуры, морфогенные и эмбриогенные каллусы и получены растения-регенеранты. В культуре изолированных микроспор в условиях оригинальных питательных сред наблюдали переход микроспор на спорофитный (эмбриогенный) путь развития, что приводило к формированию микрокаллусов (эмбриоидов). Показано, что эмбриогенные каллусные ткани исправлено переходу от эмбриогенного развития к формированию морфогенного потенциала, необходимого для быстрого и массового получения побегов-регенерантов в условиях питательных сред, традиционно используемых для морфогенеза побегов. Проведен сравнительный анализ влияния 5 вариантов температурного стресса на образование эмбриогенных каллусных тканей. Установлено, что обработка изолированных бутонов гороха низкой температурой +4°C в течение 7 суток является лучшим вариантом температурного стресса для стимулирования спорофитного развития микроспор. Показано, что оригинальные питательные среды с низким содержанием сахарозы более эффективно поддерживают инициацию эмбриогенных каллусов и эмбриоидов. Полученные результаты

могут служить основой для разработки эффективных методов получения гаплоидных растений гороха.

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. Бобков С.В. Культура *in vitro* изолированных пыльников и микроспор гороха (методические рекомендации). - Орел, - 2011. - 22 с.
4. Бобков С.В. Культура изолированных пыльников гороха // Доклады РАСХН. - 2010. - № 6. - С. 19-21. (Bobkov S.V. Isolated pea anther culture // Russian Agricultural Sciences. - 2010. - V. 6. - P. 413-416.)
5. Бобков С.В., Уваров В.Н. Каллусогенез и регенерация растений в культуре пыльников гороха // Достижения науки и техники АПК. - 2004. - № 2. - С. 2-3.
6. Бобков С.В. Использование питательной среды №6 в культуре *in vitro* изолированных пыльников гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2016. - № 4 (20). - С. 26-31.
7. Ribalta F.M., Croser J.S., Ochatt S.J. Flow cytometry enables identification of sporophytic eliciting stress treatments in gametic cells // Journal of Plant Physiology. – 2012. – V. 169. – P. 104–110.
8. 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.
9. Бобков С.В. Репрограммирование изолированных микроспор гороха на эмбриогенный путь развития // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2013. - №3. - С. 5-10.
10. Lulsdorf M.M., Croser J.S., Ochatt S. Androgenesis and doubled-haploid production in food legumes. - 2011. Chapter 11, p. 336-347. In: PRATAP A., KUMAR J. (eds): Biology and Breeding of Food Legumes. CABI, Oxfordshire.
11. Griga M., Tejklova E., Novak F.J., Kubalakov M. *In vitro* clonal propagation of *Pisum sativum* L. // Plant cell tissue organ culture. - 1986. - V.6. - P. 95-104.
12. Griga M. Direct somatic embryogenesis from shoot apical meristems of pea, and thidiazuron-induced high conversion rate of somatic embryos // Biologia plantarum. – 1998. – 41 (4). – P. 481-495.
13. Бобков С.В. Эмбриоиды и растения-регенеранты в культуре изолированных пыльников гороха (*Pisum sativum* L.) // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2012. - № 4. - С. 74-83.
14. 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.

ELABORATION OF METHODS FOR OBTAINING PEA HAPLOIDS

S.V. Bobkov

FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

Abstract. *Recent state in the area of pea androgenic haploidy was analyzed. Critical elements of elaborating method were revealed and results of our investigations were outlined. In culture of pea isolated anthers multicellular structures, morphogenic and embryogenic calli, regenerants were initiated. It was determined with use of morphological markers that several regenerants were originated from pea microspores of isolated anther. Pea isolated microspores in liquid media were reprogramed on the sporophytic pathway of development and multicellular structures were initiated. It was demonstrated that embryogenic calli were able to shift from somatic embryogenesis to formation of morphogenic potential together with shoot regeneration in conditions of traditional nutrient media designed for shoot morphogenesis. Comparative analysis of temperature stress influence on formation of embryogenic calli was conducted. It was determined that treatment of pea isolated buds with cold (+4 °C) for 7 days was the best variant of temperature stress for stimulation microspore sporophytic development. It was shown that original nutrient media with low content of sucrose maintained more efficient initiation of embryogenic calli and embryos. Results obtained in our study could be used for elaboration of reliable and effective methods in pea haploids obtaining.*

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