

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДХОДОВ В КУЛЬТИВИРОВАНИИ SHED-MICROSPORE ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ПЕРЦА СЛАДКОГО

**Вишнякова Анастасия Васильевна**, ассистент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, [a.baidina@rgau-msha.ru](mailto:a.baidina@rgau-msha.ru)

**Аннотация:** в статье приведены результаты сравнения двух методик культивирования *shed-microspore* по Supena et al., (2006) и Шмыковой Н.А. и др. (2012) для 6 генотипов перца сладкого. Показано, что культивирование пыльников перца на без гормональной питательной среде без предобработок бутонов и пыльников не вызывало формирование эмбриоидов.

**Ключевые слова:** перец сладкий, *shed-microspore*, удвоенные гаплоиды, эмбриоиды.

Использование биотехнологических подходов (культуры пыльников, микроспор, неопыленных семяпочек) позволяет быстро создать константные линии (линии удвоенные гаплоиды) из селекционных образцов, что особенно актуально при создании гетерозисных гибридов различных культур. Однако, универсальных протоколов получения удвоенных гаплоидов для различных культур не существует в виду наличия межвидовых и внутривидовых различий в отзывчивости на андрогенез.

Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов у растений рода *Capsicum* была начата в 70-х гг. с культивирования пыльников *in vitro*. В ранних исследованиях эффективность используемой технологии была крайне низкой, поэтому последующие исследования были направлены на установление факторов, которые влияют на индукцию эмбриогенеза в культуре пыльников. Последующие исследования выявили, что на формирование эмбриоидов влияют возраст и генотип растений-доноров, стадия развития микроспор в пыльниках, состав питательной среды, концентрация и комбинация регуляторов роста, органические и неорганические добавки, предобработка бутонов и/или пыльников [1].

Альтернативный способ получения удвоенных гаплоидов предложил Supena et al. [2] – культивирование пыльников и микроспор перца на двуслойной питательной среде (культура *shed-microspore*). Supena and Custers [3] достигли высокого выхода нормально выглядящих эмбриоидов (20-50%) у индонезийского острого перца. Шмыкова и др. [4] провели исследование 18 вариантов питательной среды на 6 генотипах перца сладкого в культуре *shed-microspore*. Ими было показано, что у сорта Здоровье на без гормональной питательной среде значимо увеличивается выход нормально выглядящих эмбриоидов по сравнению с гормональными питательными средами. Ari et al.

[5] апробировали культуру shed-microspore на 64 генотипах декоративного перца и сообщают, что только 1,48 эмбриоидов на цветочный бутон выглядели нормальными.

Получение удвоенных гаплоидов перца так же возможно в культуре микроспор, однако, на 1 бутон было получено только 0,1 растение-регенерант [2].

Для наших исследований мы выбрали две методики культивирования Supena et al. [3] и Шмыкова и др. [4].

Целью исследований было установить необходимость модификаций существующих методик для изучаемых генотипов, а также оценить их эффективность в получении удвоенных гаплоидов перца сладкого.

**Материалы и методы.** В эксперименте исследовали реакцию на культивирование пыльников 7 генотипов перца сладкого: 2ПМхEF2-4)F1, E68-1x7g)1Aa, кубFv2, Пм-3xE68-4)5, К-312x7т4т, 2ПМ-3хEF2-4)4 на двуслойной питательной среде.

Подготовку растений-доноров микроспор осуществляли в защищенном грунте. Рассаду выращивали в кассетах с объемом ячейки 5 см<sup>3</sup>. Посев проводили вручную в обильно увлажненный субстрат на основе сфагнового торфа с добавлением извести и удобрений 100-120 мг/л N, 120-220 мг/л P2O5, 140-240 мг/л K2O, рН 5,5-6,5, на глубину 1 см. Полив проводили по мере необходимости. Подросшую рассаду пересаживали в горшки объемом 1 л.

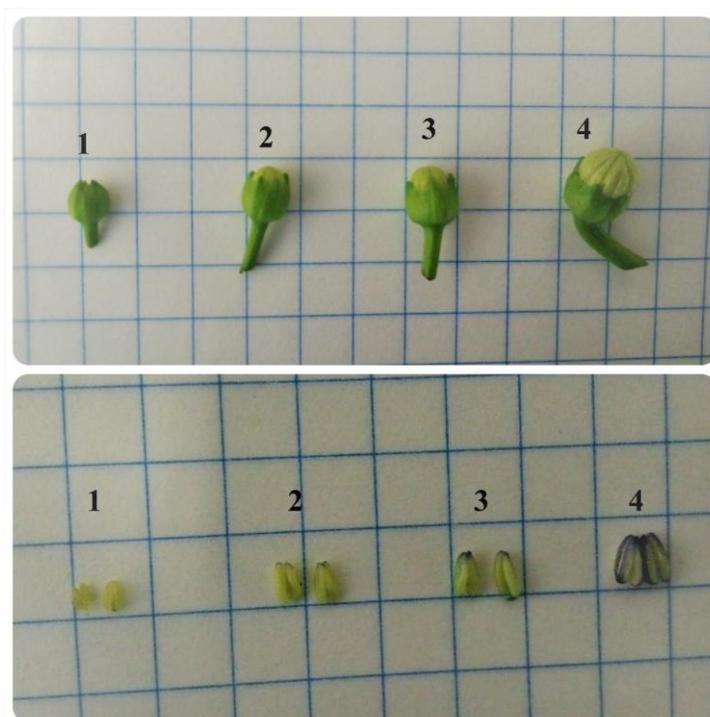
Стадию развития микроспор определяли микроскопированием клеток пыльников при окрашивании красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Соотношение венчика и чашечки определяли глазомерно, выделяя четыре градации: 1) чашечка, венчик не виден, 2) преимущественно чашечка, венчик только вышел, 3) соотношение венчика и чашечки 1:4, 4) соотношение венчика и чашечки примерно 1:1 (рис. 1). Бутоны, в которых венчик преобладает над чашечкой, а также раскрывшиеся цветки не отбирали.

Использовали 2 методики культивирования пыльников на двуслойной питательной среде:

1. По Supena – предобработку бутонов проводили в холодильнике при +7°C в течение 1 суток, после выделения пыльники первые 7 суток культивировали при температуре +7°C, затем при температуре +28°C до появления эмбриоидов. Среда для культивирования двуслойная. Состав нижнего слоя – Nitsch and Nitsch с добавлением 2% мальтозы, 1% активированного угля и 0,6% агар-агара. Состав жидкого слоя – Nitsch and Nitsch с добавлением 2% мальтозы, 2,5 мкМ зеатина и 5 мкМ ИУК.

2. По Шмыковой – предобработка бутонов и пыльников отсутствует, пыльники инкубируют при +25°C в темноте до появления эмбриоидов. Среда для культивирования двуслойная. Состав нижнего слоя – Nitsch and Nitsch с добавлением 2% мальтозы, 1% активированного угля и 0,3% фитогеля. Состав жидкого слоя – Nitsch and Nitsch с добавлением 2% мальтозы, без гормонов.

При использовании обеих методик пыльники культивировали в культуральных баночках.



**Рис. 1. Градация бутонов перца сладкого по соотношению длины венчика и чашечки и соответствующая им окраска пыльников**

- 1) чашечка, венчик не виден, пыльники имеют светло-желтую окраску 2) преимущественно чашечка, венчик только вышел, окраска пыльников светло-желтая с фиолетовым кончиком 3) соотношение венчика и чашечки 1:4, пыльники светло-желтые, около 10% пыльника окрашено в фиолетовый 4) соотношение венчика и чашечки примерно 1:1, до 80% пыльника окрашено в фиолетовый

**Результаты.** При изучении стадии развития микроспор было установлено, что в бутонах перца, где венчик не выступает за пределы чашечки (рис.1), в пыльниках находятся микроспоры в ранней одноядерной стадии развития; в бутонах, где венчик выступает за пределы чашечки на 5-10% - в поздней одноядерной стадии развития; в бутонах, где венчик выступает за пределы чашечки на 20-30% - в поздней одноядерной стадии развития и ранней двуядерной с соотношением 1:1; в бутонах с примерно одинаковым соотношением чашечки и венчика – микроспоры находятся в двуядерной стадии развития.

*Таблица*

**Количество эмбрионов перца сладкого при культивировании на двуслойной питательной среде (шт./бут.)**

Генотип растения-донора	По Supena et al. (2006)			По Шмыковой и др. (2012)		
	Соотношение длины венчика и чашечки бутонов (рис.1)			Соотношение длины венчика и чашечки бутонов (рис.1)		
	2	3	4	2	3	4
2ПМхEF2-4)F1	0	1,1	0	0	0	0
E68-1x7g)1Aa	0	112,6	0	-	0	0
кубFv2	0	0,2	0	0	0	0
Пм-3xE68-4)5	-	0	7,4	0	0	0
К-312x7т4т	-	0	0	-	0	0
2ПМ-3хEF2-4)4	-	0	1,7	-	0	0

В таблице приведены результаты эмбриогенеза сравнения двух методик культивирования (по Supena [2] и по Шмыковой [4]) для 6 генотипов перца сладкого при культивировании бутонов с различным соотношением длины чашечки и венчика.

При отсутствии обработок на без гормональной питательной среде [4] все изученные образцы перца сладкого не дали эмбриоидов. При культивировании по технологии предложенной Supena et al. [2] наблюдали появление эмбриоидов у 5 из 6 изученных генотипов. Наибольшее число эмбриоидов на бутон наблюдали у генотипа E68-1x7g)1Aa (112,6), наименьшее число эмбриоидов на бутон – у генотипа кубFv2 (0,2). Следует отметить, что нормально выглядящие эмбриоиды (рис.2) были всего у двух генотипов 2ПМхEF2-4)F1 и E68-1x7g)1Aa.



Рис. 2. Эмбриоиды генотипа 2ПМхEF2-4)F1 на питательной среде для регенерации

1. Нормально выглядящий эмбриоид 2. Корневидный эмбриоиды

При оценке выхода эмбриоидов в зависимости от вида бутонов, которые вводили в культуру видно, что эмбриоиды формировались при введении в культуру пыльников из бутонов с соотношением длины венчика и чашечки 1:4 (№3 на рис.1) у генотипов 2ПМхEF2-4)F1, E68-1x7g)1Aa, кубFv2, и бутонов с соотношением венчика и чашечки 1:1 (№4 на рис.1) у генотипов Пм-3xE68-4)5, 2ПМ-3хEF2-4)4. Такой размер бутонов соответствует поздней одноядерной и двуядерной стадии развития микроспор.

В целом технология культивирования shed-microspore по Supena [2] оказалась более эффективна, однако требует модификации для увеличения выхода нормально выглядящих эмбриоидов из которых успешно формируются растения регенеранты.

#### Библиографический список

1. Irikova T.P. Pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications / T.P. Irikova et al. // Turkish Journal of Biology, 2016. 40. – p. 719-726.

2. Supena, E.D.J. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot peppers (*Capsicum annuum* L.). / Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J.B.M. // Plant Cell, 2006. Reports 25. – P. 1–10.

3. Supena, E.D.J., Custers, J.B.M. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). / Supena, E.D.J., Custers, J.B.M. // Scientia Horticulturae 2011. 130. – P. 769–774.

4. Шмыкова Н.А. получение удвоенных гаплоидных линий перца (*Capsicum annuum* L.) через культуру пыльников/микроспор *in vitro* / Н.А. Шмыкова и др. // ВНИИСОК. – М.: Изд-во ВНИИСОК, 2012. – 36 с.

5. Ari E. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in autumn season. / Ari E., Bedir H., Yıldırım S., Yıldırım T // Turk J Biol, 2016. 40. – p. 706–717.

## **ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ, АГРОХИМИИ И ЭКОЛОГИИ**

### **СЕКЦИЯ ПОЧВОВЕДЕНИЕ, АГРОХИМИЯ, МЕЛИОРАЦИЯ И ЛЕСОВОДСТВО**

УДК 631.674.6 (470.0)

#### **БИОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ САЖЕНЦЕВ СЛИВЫ В ПЛОДОВОМ ПИТОМНИКЕ ПРИ КАПЕЛЬНОМ ОРОШЕНИИ**

*Гемонов Александр Владимирович, аспирант кафедры сельскохозяйственных мелиораций, лесоводства и землеустройства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева*

**Аннотация.** Разработаны режимы капельного орошения саженцев сливы в плодовом питомнике на дерново-подзолистой почве в условиях центральной нечерноземной зоны России. Лучшие условия роста и развития однолетних и двухлетних саженцев по комплексу биометрических показателей формируются при поддержании влажности в корнеобитаемом слое почвы в диапазоне 70-90 % и 80-100 % наименьшей влагоемкости.

**Ключевые слова:** капельное орошение, слива, питомник, режим орошения.

В настоящее время существует проблема по удовлетворению спроса населения России в плодовой и ягодной продукции согласно действующим рациональным нормам потребления [1]. Для решения этой проблемы в рамках действующей Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и