

Abstract: *The results of studying the varieties of the kidney beans and the effect of direction of sowing on their productivity and yield. It is established that investigated varieties of beans in different ways spoke in the direction of sowing. So, most of the varieties plant height was higher from sowing from South to North. Height from tip of Bob to the surface of the soil on the contrary, was higher from sowing from East to West. The yield was highest in the variety Podolyanka is 3,14 t/ha from the direction of sowing from East to West. At the same time of the sowing direction from South to North, the greatest yield was in the variety Slavia – 2,80 t/ha.*

Keywords: kidney beans, grade, direction of sowing, yield.

УДК 635.656:581.143.5

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАНТНЫХ ЛИНИЙ ГОРОХА ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ *IN VITRO*

Г.В. СОБОЛЕВА, Г.А БУДАРИНА, кандидаты сельскохозяйственных наук,

А.Н. СОБОЛЕВ*, кандидат биологических наук

ФГБНУ «ВНИИ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

*ФГБОУ ВО «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИМЕНИ И.С. ТУРГЕНЕВА»

E-mail: alniksobolev@rambler.ru

*В статье представлены результаты получения нового селекционного материала гороха с использованием селективных систем *in vitro* с ПЭГ-20% и оксипролином-15мМ, имитирующих водный дефицит. Выделены перспективные для селекции регенерантные линии, превышающие оригинальные генотипы и стандарт по элементам продуктивности (число семян в бобе, число семян с растения, масса семян с растения) и урожайностью семян 3,52-3,81 т/га. Иммунологическая оценка выявила 3 линии, характеризующиеся групповой устойчивостью к корневым гнилям и листовыебельным пятнистостям и 1 линию с комплексной устойчивостью к корневым гнилям, аскохитозу, ржавчине и гороховой тле.*

Ключевые слова: горох, каллус, осмотический стресс, регенерантные линии, урожайность, устойчивость к патогенам и фитофагам.

Участившиеся в последние годы засухи приводят к значительному снижению валовых сборов зерна гороха, основной зернобобовой культуры в Российской Федерации. С одной стороны это обусловлено тем, что согласно классификации Н.И. Вавилова [1], горох принадлежит к группе слабоустойчивых к засухе культур. С другой стороны, в производстве взят курс на возделывание высокопродуктивных безлисточковых (усатых) сортов гороха, что позволяет в значительной степени решить проблему полегаемости и повысить технологичность культуры. Но видоизменение листочков в усики привело к снижению устойчивости растений к воздушной и почвенной засухе. Также отмечается, что с ростом потенциальной продуктивности современных сортов резко снижается их устойчивость к стрессовым факторам среды. Поэтому, для обеспечения роста производства гороха в стране приоритетным направлением в селекции этой культуры является создание новых высокопродуктивных, технологичных, стрессоустойчивых и, в частности, засухоустойчивых сортов [2].

Результативность работы в этом направлении в значительной степени зависит от широкого спектра исходных форм. В связи с этим, для создания новых сортов перспективно наряду с классической селекцией использовать новые биотехнологические подходы, такие как клеточная селекция *in vitro*.

Наиболее активно методы клеточной селекции *in vitro* для отбора форм, устойчивых к засухе, разрабатываются для основных злаковых культур: кукурузы, ячменя, овса, риса, пшеницы.

В последние годы стали разрабатываться методы клеточной селекции на засухоустойчивость и для ведущих бобовых культур. Разработана селективная система с полиэтиленгликолем, позволяющая проводить скрининг генотипов сои (*Glycine max* (L.) Merrill) на устойчивость к осмотическому стрессу, коррелирующему с засухоустойчивостью и получать резистентные каллусные клоны [3]. Разработаны методические подходы и проведена селекция *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) [4]. В результате анализа в селективных условиях *in vitro* ростовых характеристик 7-дневных побегов вигны (*Vigna aconitifolia*) выделены генотипы устойчивые к осмотическому стрессу [5]. Подобный методический подход был использован при сравнительном изучении устойчивости к водному дефициту вики посевной (*Vicia sativa* L.), вики мохнатой (*Vicia villosa* Roth) и вики венгерской (*Vicia pannonica* Grantz) [6]. Проанализирована устойчивость к водному стрессу на питательных средах с ПЭГ-6000 трех видов чины (*Lathyrus sativus* L., *Lathyrus cicera* L., *Lathyrus tingitanus* L.) [7]. Проведена оценка осмоустойчивости 8 генотипов гороха (*Pisum sativum* L.). Результаты исследований показали, что селективные системы *in vitro* с ПЭГ в качестве стресс фактора, позволяют дифференцировать генотипы гороха по осмоустойчивости на уровне побегов [8]. В лаборатории генетики и биотехнологии ВНИИЗБК разработаны селективные системы для имитации *in vitro* стрессового эффекта засухи, подобраны эффективные ингибирующие концентрации стресс фактора и схема отбора резистентных к осмотическому стрессу каллусов гороха [9].

Однако для успешного использования селективных систем *in vitro* в селекционных программах бобовых культур на засухоустойчивость особую актуальность приобретает разработка методических подходов, позволяющих регенерировать из резистентных клеток растения-регенеранты, толерантные к водному стрессу.

Цель исследований – комплексная оценка по основным хозяйственно-значимым признакам, урожайности семян, устойчивости к патогенам и фитофагам регенерантных линий гороха, полученных путем клеточной селекции *in vitro*.

Материал и методика исследований

Материалом для исследований послужили регенерантные линии, полученные из резистентных к осмотическому стрессу каллусных клонов генотипов гороха: Темп, Л-135-03, Л-145-03 (белоцветковый, листочковый морфотип), Фараон, Л-190-02, Л-03-109 (белоцветковый, усатый морфотип). Для клеточной селекции *in vitro* каллус культивировали на питательных средах, содержащих один из селективных факторов: ПЭГ-20% или оксипролин -15 мМ. Регенерацию растений проводили на средах без селективных факторов. Для индукции побегообразования использовали среду, включающую: минеральные соли MS, витамины B5, мезо-инозитол – 100,0 мг/л, глицин – 2,0 мг/л, сахарозу – 30000 мг/л, агар – 6000 мг/л, БАП – 5 мг/, НУК – 2 мг/л. Ризогенная среда включала минеральные соли и витамины среды B5, с уменьшенной в два раза концентрацией основных компонентов, 30000 мг/л сахарозы, 6000 мг/л агара и дополненную НУК в концентрации 1,0-1,5 мг/л. Приготовление питательных сред, получение каллусов и культивирование проводили с использованием методик общепринятых в работе с культурами тканей *in vitro*.

Семенное потомство полученных регенерантов гороха в течение ряда лет изучалось в полевых условиях на опытном поле лаборатории генетики и биотехнологии в различных селекционных питомниках. Лучшие регенерантные линии в 2014-2016 гг. изучались по схеме конкурсного сортоиспытания на делянках площадью 15 м² в четырехкратной повторности. Норма высева семян 120 шт. на 1м². Стандарт – сорт Фараон. Контроль – оригинальные линии. Полевые опыты закладывали согласно методике полевого опыта [10]. Посев проводили в последнюю декаду апреля в

соответствии с погодными условиями. Регенерантные линии высевали сеялкой СКС-6-10. В процессе роста и развития растений проводили фенологические наблюдения. Иммунологическая оценка регенерантных линий на искусственном инфекционном и провокационном фонах к основным патогенам и фитофагам была проведена в лаборатории агротехнологий и защиты растений. При уборке анализировали структуру растений и урожайность семян регенерантных линий. Структурный анализ растений регенерантных линий по морфологическим признакам и элементам продуктивности проводили по методике ВИР [11]. Основные количественные показатели подвергали вариационно-статистической обработке.

Результаты исследований

В результате проведенных исследований установлено, что каллусные культуры прошедшие селекцию *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу, сохраняют способность к регенерации побегов. Регенерантные побеги были получены у всех изученных генотипов. В общей сложности в опыте было получено 342 побега (табл. 1). При этом, оксипролин, как селективный агент, оказывал более ингибирующее влияние на культуру каллусов гороха, в сравнении с ПЭГ. Из резистентных к оксипролину каллусов был получен в сумме по всем генотипам 71 побег, после селекции на среде с ПЭГ – 271 побег. Сформировавшиеся побеги декапитировали от каллусной ткани и переносили на среды для индукции корнеобразования. Эффективность ризогенеза у регенерантных побегов, полученных в различных селективных условиях, варьировала от 10,9% (Л-135-03) до 35,4% (Темп).

Таблица 1

Эффективность формирования регенерантных растений из каллусов, полученных в различных селективных системах *in vitro*

Генотип	Число регенерантных побегов	Эффективность ризогенеза у регенерантных побегов, %	Число полученных	
			<i>In vivo</i> фертильных растений R ₀	семян
Селективные среды с ПЭГ - 20%				
Темп	96	35,4	10	21
Л-135-03	55	10,9	2	2
Л-145-03	34	29,4	0	0
Фараон	27	22,2	1	1
Л-190-02	29	20,7	1	1
Л-03-109	30	16,7	0	0
Селективные среды с оксипролином - 15мМ				
Темп	12	16,7	0	0
Л-135-03	19	21,1	0	0
Л-145-03	4	25,0	1	1
Фараон	16	25,0	2	3
Л-190-02	12	25,0	0	0
Л-03-109	8	25,0	0	0

Регенерантные растения R₀ со сформировавшейся корневой системой высаживали в сосуды с почвой в теплице. В результате в селективной системе с ПЭГ было получено 14 фертильных регенерантов гороха генотипов: Темп (10 шт.), Л-135-03 (2 шт.), Фараон (1 шт.), Л-190-02 (1 шт.). В селективной системе с оксипролином было получено 2 фертильных растения сорта Фараон и 1 растение селекционной линии Л-145-03.

Регенерантные линии R₁ были размножены в сосудах с почвой в теплице, дальнейшие поколения регенерантов изучали в полевых условиях в течение ряда лет [12]. Из всей группы регенерантов были выделены линии R-07-11, R-08-18 (исходная линия Л-135-03), R-08-28, R-08-29, R-08-38 (исходная линия Л-145-03) характеризовавшиеся такими высокими показателями как: семенная продуктивность, водоудерживающая способность при завядании, общее содержание воды в тканях.

Исходные селекционные линии и, соответственно, регенеранты относятся к белоцветковому, листочковому, среднестебельному морфотипу.

Изучение выделенных регенерантных линий было продолжено в полевом эксперименте в 2014-2016 годах. Регенерантные линии и исходные генотипы были более скороспелыми в сравнении со стандартом. Продолжительность периода от всходов до созревания у них составила в среднем за 3 года изучения 70 суток и была на 5 суток короче стандарта – сорта Фараон.

Анализ морфологических признаков, проведенный в фазу полной спелости, показал, что длина стебля растений сорта Фараон в среднем составила 67,6 см (табл. 2). Регенерантные линии оказались более короткостебельными и по данному показателю варьировали от 58,5 см (R-08-29) до 64,8 см (R-08-18).

Таблица 2

Морфологические признаки регенерантных линий гороха (2014-2016 гг.)

Сорт, линия	Длина стебля, см.	Число			Масса		K _{хоз.} , %
		бобов	семян	семян в бобе	семян с растения, г.	1000 семян, г.	
Фараон-St	67,6	5,1	12,7	3,2	3,7	218,3	47,4
Л-135-03	64,9	4,7	16,2	3,5	4,3	271,4	52,0
R-07-11	59,5	4,8	19,7	4,1	4,9	257,1	55,6
R-08-18	64,8	5,4	21,1	4,0	5,3	259,2	55,5
Л-145-03	61,5	5,2	18,8	3,8	4,7	255,4	53,4
R-08-28	62,7	5,2	19,4	3,9	4,8	260,7	54,1
R-08-29	58,5	5,0	19,4	4,0	4,9	255,1	55,4
R-08-38	63,5	5,2	21,6	4,2	5,2	248,8	54,6

По основным показателям продуктивности (число семян с растения, масса семян с растения, масса 1000 семян) регенерантные линии превзошли как исходные генотипы, так и стандарт. В сравнении с оригинальными генотипами и стандартом регенерантные линии имели более высокие показатели коэффициента хозяйственной эффективности (K_{хоз}) – признаку, определяющему долю семян в общей надземной биомассе.

Урожайность семян белоцветкового, усатого, среднестебельного сорта Фараон в среднем составила 2,97 т/га (табл. 3).

Таблица 3

Урожайность семян регенерантных линий гороха, 2014-2016 гг.

Сорт, линия	Селективный фактор	Урожайность, т/га			Среднее за 3 года	± к стандарту
		2014	2015	2016		
Фараон-St		2,90	3,24	2,77	2,97	
Л-135-03	контроль	3,77	3,48	3,49	3,58	+0,61
R-07-11	20% ПЭГ	3,92	3,69	3,70	3,77	+0,80
R-08-18	20% ПЭГ	4,19	3,69	3,54	3,81	+0,84
Л-145-03	контроль	3,40	3,45	3,44	3,43	+0,46
R-08-28	без ПЭГ	3,61	3,42	3,64	3,56	+0,59
R-08-29	Без ПЭГ	3,49	3,51	3,56	3,52	+0,55
R-08-38	15 мМ ОП	3,89	3,65	3,71	3,75	+0,78
HCP ₀₅		0,25	0,37	0,33		

Урожайность белоцветковых, листочковых регенерантных линий была выше и варьировала в пределах от 3,52 т/га (R-08-29) до 3,81 т/га (R-08-18).

Наибольший интерес представляют регенерантные линии R-07-11 (отбор – 20% ПЭГ), R-08-18 (отбор – 20% ПЭГ) и R-08-38 (отбор – 15мМ оксипролина), которые в

течение всех лет исследований достоверно превышали стандарт по урожайности и большинству хозяйственно-ценных признаков.

Оценка регенерантных линий гороха на устойчивость к отдельным видам, а также группе патогенов на жестких инфекционных (к корневым гнилям и аскохитозу) фонах позволила выявить их высокую (в среднем на 31,0 и 40,0% превышающую у восприимчивого сорта Смарагд, и на 6,3 и 15,3 % у сорта – стандарта Фараон) устойчивость к данным болезням. К гороховой тле устойчивость изучаемых линий оказалась на 24,0–90,8% выше, чем у стандарта Фараон, что говорит о перспективности использования данных генотипов в селекции на устойчивость к фитофагу (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика регенерантных линий гороха по устойчивости к болезням и гороховой тле (инфекционный и провокационный фоны, ср. 2014 – 2016 гг.)

Сорт, линия	Развитие болезни, %					Гороховая тля (численность, экз./рас.)	Индекс устойчивости
	Фузариозная корневая гниль	Индекс устойчивости	Аскохитоз	Индекс устойчивости	Ржавчина		
Фараон (st)	49,0	B	21,4	У	24,7	22,9	У
Dun – Dale (st. устойчивости к корневым гнилям)	31,0	СУ	24,2	У	27,0	-	-
Смарагд (Ind. восприимчивости к корневым гнилям)	73,7	ВВ	26,0	С	46,0	-	-
Comet (Ind. восприимчивости к аскохитозу)	46,9	B	32,8	С	34,2	-	-
Monigul (Ind. восприимчивости к тле)	-	-	-	-	-	64,9	B
Ареал (Ind. восприимчивости к плодожорке)	-	-	-	-	-	17,4	У
Л–135–03	42,7	B	22,4	У	25,5	4,1	УУ
Р–07–11	36,5	СУ	17,3	У	24,1	5,6	УУ
Р–08–18	37,4	СУ	19,1	У	30,3	16,2	У
Л–145–03	33,7	СУ	19,2	У	19,4	9,8	УУ
Р–08–28	34,1	СУ	18,9	У	23,0	8,0	УУ
Р–08–29	40,6	СУ	17,3	У	20,1	17,3	У
Р–08–38	42,4	B	14,5	У	27,6	2,1	УУ

Примечание: У – устойчивый; С – среднеустойчивый; В – восприимчивый;
ВВ – сильновосприимчивый.

Линии гороха: Р–07–11; Р–08–28; Л–145–03 характеризуются групповой устойчивостью к корневым гнилям и листостебельным пятнистостям, а линия Р–07–11 – комплексной устойчивостью к корневым гнилям, аскохитозу, ржавчине и гороховой тле.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность использования селективных систем *in vitro*, моделирующих водный стресс с целью расширения спектра исходного материала в селекции гороха. Выделены перспективные для селекции регенерантные линии Р-07-11, Р-08-18 и Р-08-38, превысившие оригинальные генотипы и стандарт по урожайности семян и элементам продуктивности

(число семян в бобе, число семян с растения, масса семян с растения). Наибольший интерес представляет линия R-07-11, которая, кроме того, характеризуется комплексной устойчивостью к корневым гнилям, листостебельным пятнистостям, аскохитозу, ржавчине и гороховой тле.

Литература

1. Вавилов Н.И. Мировые ресурсы засухоустойчивых сортов. Избранные сочинения. Генетика и селекция. М.: Колос, 1966. – С.102-113.
2. Зотиков В.И. Роль зернобобовых и крупяных культур в адаптивности и диверсификации растениеводства // Зернобобовые и крупяные культуры, 2014. - №3 (11). – С.3-12.
3. Wahyu Windoretno, Estri Laras Arumingtyas, Nur Basuki, Andy Soegianto. Drought resistance selection on soybean somaclonal variants // J. Basic Appl. Sci. Res., 2012. – № 2 (8). – P. 7994-7997.
4. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. In vitro selection for osmotic tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Bulg. J. Plant Physiology, 1996. - V.22 (3-4). – P.30-39.
5. Priyanka Soni, Rizwan M, Bhatt K.V., Mohapatra T, Govind Sinh In vitro response of *Vigna aconitifolia* to drought stress induced by PEG – 6000 // J. of Stress Physiology and Biochemistry, 2011. – V.7. – №3. – P. 108-121.
6. Jovicic D., Nikolic Z., Zoljelar G., Milosevic D., Ignjatov M., Mikic A., Karagic D. Drought tolerance of *Vicia* sp. At germination stage // First Legume Societe Conference. Novi Sad, Serbia, 2015. – P. 125.
7. Piwowarczyk B., Kaminska I., Rybinski W. Influence of PEG generated osmotic stress on shoot regeneration and some biochemical parameters in *Lathyrus* culture // Czech J. Genet. Plant Breed., 2014. – V.50 (2). – P. 77-83.
8. Magyar-Tabori K., Dobranszki J., Hudak I., Iszaly-Toth J. Effect of osmotic stress on in vitro shoot culture of peas (*Pisum sativum* L.) // Proceedings of the third International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Leuven, Belgium, 2009. – V.812. – P. 231-235.
9. Соболева Г.В., Суворова Г.Н., Кондыков И.В., Зотиков В.И. Метод клеточной селекции гороха на устойчивость к абиотическим факторам среды (методические рекомендации) – М., 2011. – 25 с.
10. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта – М.:Колос, 1985. – 351 с.
11. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение: методические указания // Вишнякова М.А., Буравцев Т.В., Булунцев С.В. и др. – СПб.: ООП «Копи-Р. Групп», 2010. – 141 с.
12. Соболева Г.В. Сравнительная оценка регенерантных линий гороха, полученных методами клеточной селекции // Зернобобовые и крупяные культуры, 2015. – № 1 (13). – С.20-25.

COMPREHENSIVE EVALUATION OF REGENERANT PEA LINES OBTAINED BY CELL SELECTION METHOD IN VITRO

G.V. Soboleva, G.A. Budarina, A.N. Sobolev*

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

*FEDERAL STATE BUDGETARY EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER EDUCATION «OREL STATE UNIVERSITY NAMED AFTER I.S. TURGENEV»

Abstract: The article presents the results of obtaining new pea selection material using in vitro selective systems with PEG-20% and oxyproline-15 mM simulating water deficiency. Prospective regenerative lines are selected for breeding, exceeding the original genotypes and the standard for productivity elements (number of seeds in a bean, number of seeds from a plant, mass of seeds from a plant) and yield of seeds 3,52-3,81 t/ha. Immunological evaluation revealed 3 lines, characterized by group resistance to root rots and leaf-stalked spots and 1 line with complex resistance to root rots, ascochitosis, rust and pea.

Keywords: peas, callus, osmotic stress, regenerative lines, yield, resistance to pathogens and phytophages.