

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ ГОРОХА С ИЗМЕНЕННОЙ АРХИТЕКТОНИКОЙ ЛИСТОВОГО АППАРАТА

Г.В. СОБОЛЕВА, А.А. ЗЕЛЕНОВ, кандидаты сельскохозяйственных наук
А.Н. СОБОЛЕВ*, кандидат биологических наук

ФГБНУ «ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»
* ФГБОУ ВО «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.С. ТУРГЕНЕВА»

E-mail: alniksobolev@rambler.ru

*В статье представлены результаты сравнительной оценки устойчивости к осмотическому стрессу перспективных селекционных линий гороха ВНИИЗБК рассеченнолисточкового (Рас-665/7, Рас-678/7, Рас-828/9, Рас-1070/8) и многократно непарноперистого (Пап-485/4, Пап-772/7, Пап-1126/8) морфотипов. Тестовыми показателями, отражающими общую реакцию на водный стресс служили: параметры роста на ранних этапах развития (всхожесть семян, относительный рост зародышевого корня), интенсивность роста клеточных популяций *in vitro*, а так же показатели водного режима целых растений (водоудерживающая способность в процессе завядания, общее содержание воды в тканях). Показано, что селективные системы с 15% ПЭГ позволяют тестировать генотипы гороха по устойчивости к водному дефициту как на ранних этапах развития растений, так и на уровне клеточных популяций *in vitro*. В результате комплексной оценки установлено, что в среднем линии с многократно непарноперистым типом листа характеризовались большей устойчивостью к водному стрессу в сравнении с линиями рассеченнолисточкового морфотипа. Среди изученного набора генотипов выделены селекционные линии Пап-1126/8 и Рас-828/9 обладающие высокой осмоустойчивостью.*

Ключевые слова: горох, селекционные линии, осмотический стресс, устойчивость, полиэтиленгликоль (ПЭГ), каллус, *in vitro*.

Современные сорта гороха, ведущей зернобобовой культуры в Российской Федерации, обладают потенциалом урожайности 5,5-6,0 т/га. Однако уровень реализации урожайного потенциала в производстве остается недостаточно высоким, что обусловлено, в частности, снижением устойчивости растений современных высокопродуктивных сортов гороха к экстремальным условиям среды [1, 2]. Определяющим фактором внешней среды, обеспечивающим получение высоких и стабильных урожаев гороха, являются условия увлажнения [3]. Поэтому, в условиях наблюдающегося глобального потепления и участвующих засухах в основных зонах выращивания гороха особую актуальность приобретает создание высокопродуктивных, технологичных, засухоустойчивых сортов. При этом следует учесть, что приоритетным направлением повышения продуктивности и технологичности культуры в последние годы является поиск и создание новых листочковых морфотипов гороха с высоким биологическим и адаптивным потенциалом.

Адаптация растений к водному дефициту представляет собой сложную систему структур и функций, которые действуют как на клеточном, так и на организменном уровне. В связи с этим, в селекционный процесс должен быть вовлечен весь комплекс имеющихся методических подходов, способных существенно расширить спектр исходного материала. Актуальное значение для оценки и направленного отбора на устойчивость к засухе имеют физиологические методы. Новым методологическим подходом в решении данной проблемы можно считать клеточную селекцию *in vitro*.

Бобовые культуры являются сложным объектом для работы *in vitro*, что связано с невысоким морфогенетическим потенциалом и сложностью регенерации растений. Тем не менее, в последние годы стали разрабатываться методы клеточной селекции на засухоустойчивость и для ведущих бобовых культур. Разработана технология клеточной селекции *in vitro*, позволяющая проводить тестирование генотипов сои (*Glycine max* (L.) Merrill) на уровне каллусных культур по устойчивости к осмотическому стрессу, коррелирующему с засухоустойчивостью [4]. Разработаны методические подходы селекции *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) [5]. Проведены исследования, показавшие, что в результате анализа ростовых характеристик побегов на селективных средах *in vitro* возможна идентификация генотипов вигны (*Vigna aconitifolia*) по устойчивости к засухе [6]. 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) [7]. Проанализирована устойчивость к водному стрессу на питательных средах с ПЭГ-6000 трех видов чины (*Lathyrus sativus* L., *Lathyrus cicera* L., *Lathyrus tingitanus* L.) и некоторых сортов чины посевной [8]. Изучено *in vitro* влияние осмотического стресса на узловые экспланты гороха (*Pisum sativum* L.) [9]. В лаборатории генетики и биотехнологии ВНИИЗБК (Орел) разработаны селективные системы, имитирующие *in vitro* стрессовый эффект обезвоживания, подобраны стресс факторы и их эффективные ингибирующие концентрации, схема отбора резистентных к осмотическому стрессу каллусов гороха [10, 11].

Среди большого разнообразия морфотипов гороха, вовлеченных в селекционный процесс с точки зрения засухи, наиболее подробно изучены листочковые и усатые генотипы, и практически не изучались обладающие высокими фотосинтетическими показателями перспективные рассеченнолисточковые и многократно непарнопериостые генотипы.

Цель исследований – сравнительная оценка устойчивости к осмотическому стрессу перспективных селекционных линий гороха рассеченнолисточкового и многократно непарнопериостого морфотипов.

Материал и методика

Материалом для исследований служили 7 селекционных линий гороха рассеченнолисточкового (Рас-665/7, Рас-678/7, Рас-828/9, Рас-1070/8) и многократно непарнопериостого (Пап-485/4, Пап-772/7, Пап-1126/8) морфотипов. Контроль – сорт Фараон.

Оценку устойчивости генотипов гороха к дефициту влаги осуществляли на питательных средах, содержащих для имитации водного дефицита не ионный, не проникающий осмотик–полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 (ПЭГ) в концентрации 15%. Контроль – питательная среда MS₁₂ без селективного фактора. Тестовыми показателями, отражающими общую реакцию растений на устойчивость к засухе, являлись параметры роста на ранних этапах развития (всхожесть семян в растворе ПЭГ в % к контролю), относительный рост корня (длина зародышевого корня на ПЭГ в % к контролю). При проведении отбора повторность 5-кратная, число семян в повторности – 20. Подсчет проросших семян проводили на 7 сутки. Оценку устойчивости генотипов гороха к дефициту влаги на клеточном уровне также осуществляли на питательных средах. Осмотический стресс моделировался введением в состав сред 15% ПЭГ. Контроль – питательные среды без селективного фактора. На питательные среды инокулировано по 20 эксплантов каждого генотипа. Повторность 3^х – кратная. Показателем устойчивости на клеточном уровне служила интенсивность роста каллусной массы. Рост каллусной ткани анализировался в конце одного цикла культивирования каллусов на селективных средах. Продолжительность пассажа составляла 45...50 суток. Каллусы выращивали на свету при 16-часовом фотопериоде и освещенности 2000 лк. В качестве основы питательных сред использовали: минеральные соли, согласно протоколу MS [12], витамины, согласно протоколу B5 [13], мезо-инозитол – 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, сахароза – 30000 мг/л и регуляторы роста: цитокинин (БАП) 5 мг/л и ауксин (НУК) 2 мг/л. Приготовление питательных сред, получение каллусов и культивирование проводили с использованием методик общепринятых в работе с

культурами тканей *in vitro*. Среда, содержащая ПЭГ, остаются жидкими, поэтому каллусные ткани инкубировали на подложках из фильтровальной бумаги, в стеклянных стаканчиках высотой 6-8 см, диаметром 4,5 см. Водоудерживающую способность растений определяли в фазе бутонизация-начало цветения методом завядания срезанных растений, в десятикратной повторности по Н.Н. Третьякову (1990). Основные количественные показатели подвергали вариационно-статистической обработке по Б.А. Доспехову (1985).

Результаты и обсуждение

Всхожесть семян является первой критической и наиболее чувствительной фазой в жизненном цикле растений. Поэтому, анализ скорости прорастания семян в условиях водного дефицита отражает способность генотипов использовать труднодоступную влагу и служит косвенным показателем относительной устойчивости к засухе.

При проращивании семян в культуре *in vitro* на селективных питательных средах содержащих для имитации водного стресса 15% ПЭГ, установлено, что все изученные генотипы гороха по способности прорасти в созданных условиях водного дефицита характеризовались как осмоустойчивые. Уровень устойчивости (всхожесть семян в условиях дефицита воды в % к контролю) был в пределах 85-100% (табл. 1).

Таблица 1

Уровень осмоустойчивости и показатели начального роста корня у 7-ми суточных проростков гороха *in vitro* в условиях осмотического стресса (15% ПЭГ)

№ п/п	Генотип	Всхожесть семян, %			Длина зародышевого корня, см.		
		Контроль (MS ₁₂)	MS ₁₂ +15% ПЭГ	Уровень устойчивости *	Контроль (MS ₁₂)	MS ₁₂ +15% ПЭГ	Относит. рост корня, %
Рассеченнолисточковый морфотип							
1	Рас-665/7	100	85	85,0	2,07	1,29	62,32
2	Рас-678/7	100	85	85,0	1,50	0,92	61,33
3	Рас-828/9	90	80	88,9	1,27	0,81	63,78
4	Рас-1070/8	100	100	100	1,85	1,16	62,70
<i>Среднее по группе</i>		97,5	87,5	89,73	1,67	1,05	62,53
Многokrратно непарноперистый морфотип							
5	Пап-485/4	90	90	100,0	2,22	1,33	59,91
6	Пап-772/7	100	90	90,0	1,67	1,31	78,44
7	Пап-1126/8	100	95	95,0	1,20	0,94	78,33
<i>Среднее по группе</i>		96,7	91,7	95,0	1,70	1,19	72,23
8	Фараон st.	100	90	90,0	3,02	1,90	62,91

*Уровень устойчивости – всхожесть семян в условиях осмотического стресса в % к контролю

При этом у линий с многократно непарноперистым типом листа уровень устойчивости в среднем по группе составил 95%, у линий рассеченнолисточкового морфотипа – 89,73%. Стандарт (сорт Фараон) – 90%. Различия изученных генотипов по реакции на осмотический стресс в данном опыте наиболее четко проявились по такому показателю, как относительный рост зародышевого корня. В опыте величина этого показателя варьировала от 59,91% (Пап-485/4) до 78,44% (Пап-772/7). Контроль – 62,91% (Фараон). Максимальные значения параметра отмечены у линий с многократно непарноперистым типом листа Пап-772/7 (78,44%) и Пап-1126/8 (78,33%). Сравнительный анализ показал, что линии с многократно непарноперистым типом листа по длине зародышевого корня в среднем превзошли рассеченнолисточковые линии (на 9,7%) и контроль (на 9,32%).

В связи с тем, что засухоустойчивость во многом определяется сосущей силой клеток, был проведен сравнительный анализ устойчивости к осмотическому стрессу селекционных линий с измененной архитектоникой листового аппарата на клеточном уровне *in vitro*. Так

же важным моментом является то, что полученные осмоустойчивые каллусные клоны являются перспективным источником исходного материала на засухоустойчивость, так как представляют собой специфические биологические популяции соматических клеток, среди которых возможен отбор спонтанных соматональных вариантов.

Установлено, что в контрольном варианте (питательные среды без ПЭГ), масса каллусов относительно начального веса увеличивалась от 9,09 (сорт Фараон) до 38,27 раз (Пап-485/4) (табл. 2).

Таблица 2

Влияние осмотического стресса на рост каллуса генотипов гороха с измененной архитектурой листового аппарата

№ п/п	Генотип	Среда	Начальный вес каллуса, г.	Прирост каллуса, г.	Относительный прирост каллуса	
					От начального веса	% к контролю
Рассеченнолисточковый морфотип						
1	Рас-665/7	MS ₁₂	0,1416	1,5593	11,05	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,1539	0,5613	3,65	33,15
2	Рас-678/7	MS ₁₂	0,1085	1,5139	13,95	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,1039	0,6277	6,04	43,30
3	Рас-828/9	MS ₁₂	0,1119	1,5571	13,91	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,1260	0,9119	7,24	52,05
4	Рас-1070/8	MS ₁₂	0,0800	0,8792	10,99	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,0662	0,2418	3,65	33,21
<i>Среднее по группе</i>						40,43
Множественно непарноперистый морфотип						
5	Пап-485/4	MS ₁₂	0,0375	1,4351	38,27	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,0435	0,9896	22,75	59,45
6	Пап- 772/7	MS ₁₂	0,0970	1,3542	13,96	
		MS ₁₂ +15% ПЭГ	0,0988	0,6320	6,40	45,84
7	Пап - 1126/8	MS ₁₂	0,0873	1,1133	12,75	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,0550	0,3658	6,65	52,16
<i>Среднее по группе</i>						52,48
8	Фараон	MS ₁₂	0,0731	0,6642	9,09	
		MS ₁₂ + 15% ПЭГ	0,0668	0,1357	2,03	22,33

Выявлено, что содержание в питательной среде 15% ПЭГ оказывает ингибирующее влияние на рост каллусов всех генотипов (рис.). Прирост каллусной массы относительно начального веса увеличивался от 2,03 (сорт Фараон) до 22,75 раз (Пап-485/4). Показано, что для сравнительной оценки генотипов по устойчивости к осмотическому стрессу наиболее дифференцирующим показателем является прирост каллуса относительно контроля.

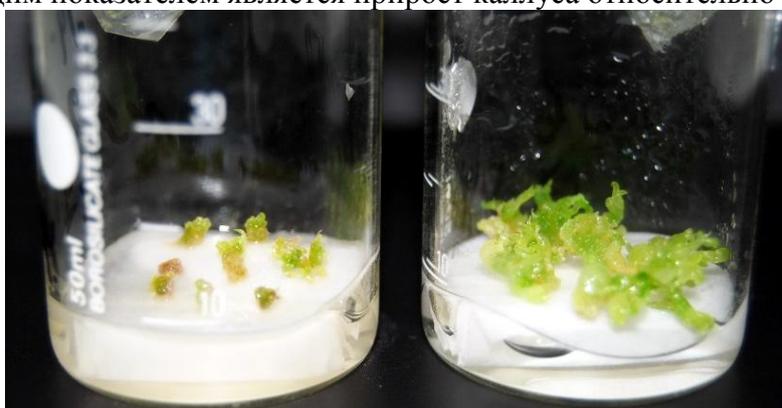


Рис. Влияние осмотического стресса на рост каллусов селекционной линии Рас-1070/8 (слева-селективная среда с 15% ПЭГ, справа-контроль)

Среди изученного набора генотипов наибольшую устойчивость к водному дефициту продемонстрировали культивируемые ткани линий Пап-485/4, Пап-1126/7 (многократно непарноперистый морфотип) и Рас-828/9 (рассеченнолисточковый морфотип). Прирост каллусов у данных генотипов относительно контроля составил 59,45%, 52,16% и 52,05% соответственно. Сорт Фараон (стандарт) оказался наиболее чувствительным к осмотическому стрессу. Относительный прирост каллуса к контролю составил 22,33%. Установлено, что в среднем линии с многократно непарноперистым типом листа характеризовались большей устойчивостью к водному стрессу в сравнении с линиями рассеченнолисточкового морфотипа. Прирост каллуса относительно контроля в среднем по группе линий с многократно непарноперистым типом листа составил 52,48%. По группе линий рассеченнолисточкового морфотипа данный показатель составил 40,43%.

Среди механизмов адаптации растений к абиотическим стрессам важная роль отводится таким показателям водного режима, как водоудерживающая способность тканей растений и общая оводненность, определяемыми в критический период гороха к недостатку влаги (фаза бутонизация – цветение). Анализ данных показал, что практически все изученные генотипы характеризуются статистически достоверно более высокой способностью удерживать воду в процессе завядания в сравнении с контролем (табл. 3).

Таблица 3

Потери воды в % от её первоначальной массы и общее содержание воды в тканях растений селекционных линий гороха, 2015-2016 гг. (Фаза бутонизация – начало цветения)

№ п/п	Генотип	Потери воды, %			Общее содержание воды в тканях, %		
		2015 г.	2016 г.	среднее	2015 г.	2016 г.	среднее
Рассеченнолисточковый морфотип							
1	Рас-665/7	24,15	38,23	31,19	78,64	83,64	81,14
2	Рас-678/7	23,49	32,30	27,90	77,59	83,60	80,60
3	Рас-828/9	19,96	29,92	24,94	79,71	84,03	81,87
4	Рас-1070/9	24,71	35,41	30,06	77,17	82,35	79,76
<i>Среднее по группе</i>		<i>23,08</i>	<i>33,97</i>	<i>28,52</i>	<i>78,28</i>	<i>83,41</i>	<i>80,84</i>
Многократно непарноперистый морфотип							
5	Пап-485/4	26,57	28,14	27,36	81,49	83,85	82,67
6	Пап-772/7	21,61	29,02	25,32	81,16	84,34	82,75
7	Пап-1126/8	21,32	27,98	24,65	81,01	81,37	81,19
<i>Среднее по группе</i>		<i>23,17</i>	<i>28,38</i>	<i>25,78</i>	<i>81,22</i>	<i>83,19</i>	<i>82,20</i>
8	Фараон-St	26,07	40,71	33,39	79,10	82,91	81,01
<i>НСР₀₅</i>		<i>1,84</i>	<i>4,67</i>		<i>1,17</i>	<i>1,30</i>	

Потери воды растениями сорта Фараон за 6 часов завядания составили в среднем за 2 года изучения (2015-2016 гг.) 33,39% от начального веса. У селекционных линий данный показатель находился в пределах от 24,65% (Пап-1126/8) до 31,19% (Рас-665/7). В среднем, у линий с многократно непарноперистым типом листа потери воды при завядании составили 25,78%, у линий рассеченнолисточкового морфотипа – 28,52%. Содержание воды в тканях, опосредованно отражающее работу корневой системы, у всех изученных селекционных линий было на уровне стандарта (81,01%) и варьировало от 79,76% (Рас-1070/9) до 82,75% (пап-772/7).

Таким образом, в результате комплексной оценки установлено, что линии с многократно непарноперистым типом листа характеризовались в среднем большей устойчивостью к водному стрессу в сравнении с линиями рассеченнолисточкового морфотипа. Среди изученного набора генотипов выделены селекционные линии Пап-1126/8 и Рас-828/9 обладающие высокой осмоустойчивостью.

Литература

1. Зотиков В.И., Наумкина Т.С., Сидоренко В.С., Грядунова Н.В., Наумкин В.В. Зернобобовые культуры – важный фактор устойчивого экологически ориентированного сельского хозяйства // Зернобобовые и крупяные культуры. – Орел, – 2016. – №1 (17). – С. 6-13.

2. Зеленов А.Н., Зеленов А.А. Повышение биоэнергетического потенциала растений – актуальная проблема селекции гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. – Орел, – 2016. – № 4 (20). – С. 9-15.
3. Лысенко А.А., Коробов А.П., Шапошников Ю.В. Влияние погодных условий на урожайность сортов гороха в условиях Приазовской зоны Ростовской области // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, – 2017. – С. 37-40.
4. Sunaryo W., Widoretno W., Nurhasanah, Sudarsono. Drought tolerance selection of soybean lines generated from somatic embryogenesis using osmotic stress simulation of poly-ethylene glycol (PEG) // Nusantara Bioscience, - 2016. –V.8. – № 1. – P. 45-54.
5. 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.
6. 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.
7. 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..
8. Piwowarczyk B., Tokarz K., Makowski W., Lukasiewicz A. Dufferent acclimatization mechanisms of two grass pea cultivars to osmotic stress in in vitro culture // Acta Physoilogiae Plantarum, – 2017. – V.39. – P. 96-101.
9. 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.
10. Соболева Г.В. Влияние осмотического стресса на процессы роста и морфогенеза в длительно пассируемых каллусных культурах гороха (*Pisum sativum* L.) // Зернобобовые и крупяные культуры, 2013. – №1(5). – С. 8-15.
11. Соболева Г.В. Использование биотехнологических методов в селекции гороха // Материалы VIII съезда общества физиологов России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Петрозаводск, 2015. – С. 499.
12. Murashige N., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. –V.15. – No.13. – P. 473-497.
13. Gamborg O.L., Constabel F., Shyluk I.P. Organogenesis in callus from shoot apical of *Pisum sativum* L. // *Physiologia Plantarum.* – 1974. – V.30. – P. 125-128.

COMPARATIVE EVALUATION OF RESISTANCE TO OSMOTIC STRESS OF PERSPECTIVE PEA BREEDING LINES WITH ALTERED ARCHITECTONICS OF THE LEAF APPARATUS

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

FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

* FGBOU VO «OREL STATE UNIVERSITY NAMED AFTER I.S.TURGENEV»

E-mail: alniksobolev@rambler.ru

Abstract: *The article presents results of a comparative assessment of resistance to osmotic stress of promising breeding lines of pea from VNIIZBK: dissected pinnuled leaf (Ras-665/7, Ras - 678/7, Ras -828/9, Ras -1070/8) and repeatedly pinnuled leaf (Pap-485/4, Pap-772/7, Pap-1126/8) morphotypes. Test parameters reflecting the general response to water stress were: growth parameters in the early stages of development (seed germination, relative growth of the germinal root), growth rate of cell populations in vitro, as well as water regime of whole plants (water retention in the wilting process, total water content in tissues). It is shown that selective systems with 15% PEG (polyethylene glycol) allow testing pea genotypes for resistance to water deficiency both in the early stages of plant development and at the level of cell populations in vitro. As a result of the integrated assessment, it was established that on average, the lines with repeatedly pinnuled leaf type were characterized by greater resistance to water stress in comparison to the lines of the dissected pinnuled leaf morphotype. Among the studied set of genotypes, selection lines Pap-1126/8 and Ras-828/9 possess high osmosis stability.*

Keywords: peas, selection lines, osmotic stress, resistance, PEG, callus, *in vitro*.