

DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11109

УДК 635.656:581.143.5

## СКРИНИНГ РАЗЛИЧНЫХ МОРФОТИПОВ ГОРОХА ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ В СЕЛЕКТИВНЫХ СИСТЕМАХ *IN VITRO*

Г.В. СОБОЛЕВА, кандидат 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

*Представлены результаты сравнительной оценки генотипов гороха листочкового и безлисточкового (усатого) морфотипов по устойчивости к осмотическому стрессу in vitro на клеточном уровне. Тестовыми показателями осмоустойчивости служили интенсивность роста каллусной массы на селективных средах с 20% ПЭГ и способность к регенерации побегов. Не выявлено значительных отличий по осмоустойчивости между различными морфотипами. Устойчивые к осмотическому стрессу генотипы были получены как среди листочковых (Л-135-03), так и среди усатых (Л-03-109) морфотипов. Тем не менее, в среднем по группе листочковые генотипы отличались несколько большей устойчивостью к осмотическому стрессу по сравнению с безлисточковыми генотипами. По способности к формированию побегов из резистентных каллусов в среднем по группе листочковые морфотипы так же превосходили усатые. Показано, что для проведения анализа устойчивости к осмотическому стрессу, на клеточном уровне можно использовать каллусные ткани различного времени пассирования in vitro. Однако, в связи с тем, что регенерационная способность длительно пассируемых каллусов резко снижается отбор целесообразно проводить используя молодые каллусы. Выделены перспективные для селекции регенерантные линии R-07-11, R-08-18, превысившие оригинальные генотипы и стандарт по урожайности семян.*

**Ключевые слова:** горох посевной, *in vitro*, осмотический стресс, каллус, устойчивость.

В последнее время методы культуры тканей и клеток находят все более широкое применение в селекции важнейших сельскохозяйственных культур. Наиболее распространенным методом является клеточная селекция *in vitro*, позволяющая проводить тестирование генотипов по устойчивости к различным воздействиям (засуха, засоление и др.) на уровне клеточных популяций, а также вести отбор из клеточных популяций резистентных клеток и получать целые растения-регенеранты. С целью имитации *in vitro* стрессового эффекта обычно используется метод прямой селекции, при котором в питательную среду вводится определенный селективный фактор [1].

Отбор *in vitro* на устойчивость проводится, как правило, в каллусных культурах. Одним из показателей, характеризующих устойчивость генотипов к моделируемому стрессу, является скорость роста каллусных культур в селективных условиях. При этом установлено, что скорость роста и морфология каллусов на разных этапах культивирования могут претерпевать существенные изменения. Это связано с тем, что получение каллусных культур предполагает приспособление клеток к условиям существования *in vitro*, выходящим за пределы нормы реакции их генома. На первом этапе культивирования это приводит к действию дестабилизирующего отбора и усилению генетической изменчивости. Затем, в процессе длительного культивирования, под действием стабилизирующего отбора формируется клеточная популяция, которой свойственен физиологический и генетический гомеостаз [2, 3]. В результате, может изменяться и чувствительность каллусов к моделируемому *in vitro* стрессу. В опубликованной литературе по клеточной селекции отсутствуют данные о том, какие каллусы целесообразно использовать для отбора: молодые

или длительно пассируемые. При этом показано, что каждый вид растений имеет свою чувствительность к содержанию селективного фактора в питательной среде. Исходя из этого, методы клеточной селекции должны быть, разработаны для каждого конкретного вида растений.

В настоящее время особую актуальность приобретает разработка селективных систем *in vitro* для отбора засухоустойчивых вариантов гороха, ведущей зернобобовой культуры в Российской Федерации. Это обусловлено наблюдающимся глобальным потеплением и участвовавшими засухами в основных зонах выращивания культуры, а также низкой результативностью традиционной селекции на этот признак, обусловленной отсутствием доноров засухоустойчивости.

Современная селекция гороха ориентирована на создание безлисточковых (усатых) сортов, так как это позволяет в значительной степени решить проблему полегаемости и повысить технологичность культуры [4]. Однако, в сравнении с листочковыми морфотипами сорта гороха с усатым типом листа более подвержены стрессовым факторам среды и, в частности, к водному дефициту [5]. Поэтому, современные сорта гороха должны сочетать не только высокую продуктивность, но и устойчивость к засухе. Вследствие чего, разработка результативных клеточных систем для выделения устойчивых к осмотическому стрессу линий гороха и получение растений-регенерантов, устойчивых к засухе приобретает первостепенное значение.

**Цель исследований** заключалась в сравнительной оценке устойчивости к осмотическому стрессу *in vitro* листочковых и безлисточковых (усатых) морфотипов гороха на уровне каллусных культур различного времени культивирования.

#### **Материал и методика исследований**

Материалом для исследований служили 6 генотипов гороха, относящихся к различным морфотипам: Темп, Л-135-03, Л-145-03 (белоцветковый, листочковый тип), Фараон, Л-190-02, Л-03-109 (белоцветковый, усатый тип). В качестве исходного материала для проведения анализа устойчивости к осмотическому стрессу на клеточном уровне использовали каллусные ткани, различного времени пассирования *in vitro*. Оценка устойчивости генотипов гороха к дефициту влаги осуществляли на питательных средах, содержащих для имитации водного дефицита не ионный, не проникающий осмотик – 20% ПЭГ (полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000). Контроль – питательные среды без селективного фактора. Начальная масса каллусов – 45-50 мг. Показателем устойчивости на клеточном уровне служила интенсивность роста каллусной массы. Прирост каллусов анализировали в конце одного цикла культивирования на селективных средах. Продолжительность пассажа составляла 45...50 суток. Регенерацию растений проводили на средах без селективного фактора. В качестве основы питательных сред использовали минеральные соли согласно протоколу MS [6], витамины согласно протоколу B5 [7], мезо-инозитол – 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, сахароза – 30000 мг/л, агар – 6000 мг/л и регуляторы роста: цитокинины (БАП) и ауксины (НУК, ИМК) в различных сочетаниях. Индукцию ризогенеза у регенерантных побегов осуществляли *in vitro* на питательных средах дополненных НУК в концентрации 1,0-1,5 мг/л. Приготовление питательных сред, получение каллусов и пассирование проводили с использованием методик, разработанных ранее [8, 9]. Полевые опыты закладывали согласно методике полевого опыта [10] в севообороте лаборатории генетики и биотехнологии ФНЦ ЗБК. Посев проводили в последнюю декаду апреля в соответствии с погодными условиями. Регенерантные линии высевали сеялкой СКС-6-10. Учетная площадь делянки 15м<sup>2</sup>. Норма высева семян 120 шт. на 1м<sup>2</sup>. Регенерантные линии высевали в четырех повторностях, рендомизированно. Основные количественные показатели подвергали вариационно-статистической обработке [10].

#### **Результаты и обсуждение**

В результате проведенных исследований установлено, что длительно пассируемые ткани более чувствительны к осмотическому стрессу (табл. 1). Прирост молодой (120-135 суток *in vitro*) ткани на селективной среде варьировал от 14,2% (Л-145-03) до 82,4% (Л-135-

03) от контроля. В длительно пассируемых тканях (1350-1400 суток) данный показатель оказался значительно ниже и был в пределах 13,5-30,9%. В наибольшей степени ингибирование роста длительно пассируемых каллусов было отмечено для тех генотипов, которые характеризовались максимальной устойчивостью на ранних этапах культивирования каллусов. Так, у линии Л-135-03, прирост молодых тканей на селективных средах составлял 82,4% от контроля, с увеличением продолжительности культивирования каллусов данный показатель резко снижался и составлял всего 30,9%. В то же время у генотипа Л-145-03 показатели устойчивости у молодых (14,2%) и длительно пассируемых (13,5%) каллусов отличались незначительно.

Выявлены генотипические различия по реакции на осмотический стресс. Наибольшая устойчивость как молодого, так и длительно культивируемого каллуса отмечена для генотипа Л-135-03, а наименьшая устойчивость отмечена для генотипа Л-145-03. Данные генотипы относятся к листочковому, белоцветковому морфотипу. Следовательно, скрининг генотипов по осмоустойчивости на клеточном уровне можно проводить, используя как молодой, так и длительно пассируемый каллус.

Таблица 1

**Влияние осмотического стресса на интенсивность роста каллуса различных морфотипов гороха**

Генотип	Среда	Молодой каллус		Длительно пассируемый каллус	
		$\Delta W/W_0$	В % к контролю	$\Delta W/W_0$	В % к контролю
Листочковые морфотипы					
Темп	St	1,01		1,71	
	St + 20% ПЭГ	0,40	39,75	0,43	25,15
Л-135-03	St	3,07		2,62	
	St + 20% ПЭГ	2,53	82,41	0,81	30,92
Л-145-03	St	10,20		4,22	
	St + 20% ПЭГ	1,45	14,22	0,57	13,51
Среднее по группе	St	4,76		2,85	
	St + 20% ПЭГ	1,46	45,50	0,60	21,01
Безлисточковые морфотипы					
Фараон	St	5,68		3,89	
	St + 20% ПЭГ	1,66	29,23	0,65	16,71
Л-190-02	St	2,10		1,88	
	St + 20% ПЭГ	0,74	35,24	0,38	20,21
Л-03-109	St	3,24		3,14	
	St + 20% ПЭГ	2,00	61,73	0,58	18,47
Среднее по группе	St	3,67		2,97	
	St + 20% ПЭГ	1,47	40,05	0,54	18,07

Примечание:  $W_0$  – начальный вес каллуса, мг;

$\Delta W$  – прирост каллуса, мг.

$\Delta W/W_0$  – относительный прирост каллуса;

Молодой каллус – время культивирования *in vitro* 120-135 суток

Длительно пассируемый каллус – время культивирования *in vitro* 1350-1400 суток

Не выявлено значительных отличий по осмоустойчивости между разными морфотипами. Тем не менее, в среднем по группе листочковые генотипы отличались несколько большей устойчивостью к осмотическому стрессу по сравнению с безлисточковыми генотипами.

Для достижения успешных результатов при разработке селективных систем *in vitro* необходимо иметь стабильную систему регенерации. Горох считается одним из наиболее проблемных объектов культуры тканей *in vitro*.

Регенерацию растений гороха проводили на средах без селективного фактора в три этапа. Первый заключался в том, что устойчивые каллусы культивировали на средах с высоким содержанием БАП (4,5-5,0 мг/л) в сочетании с 2,0 мг/л НУК для инициации

побегообразования. На втором этапе регенерантные побеги декапитировали от каллусной ткани и дорастивали на питательных средах, содержащих 0,2 мг/л ИМК и 1,0 мг/л БАП. Третий этап заключался в индукции ризогенеза у сформировавшихся побегов. Индукцию ризогенеза у полученных побегов гороха осуществляли на агаризованных питательных средах с добавлением НУК (1,0-1,5 мг/л).

В результате проведенных исследований установлено, что каллусные культуры прошедшие отбор *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу, сохраняют способность к регенерации побегов (табл. 2). Регенерантные побеги были получены у всех изученных генотипов. Из резистентных каллусов возрастом 120-135 суток в общей сложности было получено 277 побегов. Максимальное число побегов было получено у сорта Темп (72 шт.), минимальное – у сорта Фараон (27 шт.). Сравнительный анализ показал, что в среднем по группе листочковые генотипы по числу побегов (61,6 шт.) превосходили усатые морфотипы (28,7 шт.).

Таблица 2

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

Генотип	Молодой каллус			Длительно пассируемый каллус		
	Число регенерантных побегов	Число побегов с корнями	Число фертильных растений R <sub>0</sub>	Число регенерантных побегов	Число побегов с корнями	Число фертильных растений R <sub>0</sub>
Листочковые морфотипы						
Темп	96	34	10	10	2	0
Л-135-03	55	6	2	10	3	0
Л-145-03	34	10	0	10	1	0
<i>Среднее по группе</i>	<i>61,6</i>	<i>16,7</i>	<i>4,0</i>	<i>10,0</i>	<i>2,0</i>	<i>0</i>
Безлисточковые морфотипы						
Фараон	27	6	1	4	1	0
Л-190-02	29	6	1	8	3	0
Л-03-109	30	5	0	5	0	0
<i>Среднее по группе</i>	<i>28,7</i>	<i>5,7</i>	<i>0,7</i>	<i>5,7</i>	<i>1,3</i>	<i>0</i>

В культуре длительно пассируемых каллусов (1350-1400 суток) гороха после селекции на ПЭГ было получено 47 побегов. Большая часть полученных из каллусных клонов побегов имела нормальную морфологию, однако встречались побеги с высоким уровнем витрификации. Часто образовавшиеся микропобеги так и оставались в зачаточном состоянии, не развиваясь дальше.

Установлено, что по способности к регенерации побегов из резистентных как молодых, так и длительно пассируемых каллусов и индукции ризогенеза в среднем по группе листочковые морфотипы превосходили усатые.

Регенерантные растения R<sub>0</sub> со сформировавшейся корневой системой высаживали в сосуды с почвой в теплице. В результате в культуре молодых каллусов было получено 14 фертильных регенерантов гороха генотипов: Темп (10 шт.), Л-135-03 (2 шт.), Фараон (1 шт.), Л-190-02 (1 шт.). После пересадки в почву получить регенерантные растения из длительно пассируемых каллусов не удалось.

Регенерантные линии R<sub>1</sub> были размножены в сосудах с почвой в теплице, дальнейшие поколения регенерантов изучали в полевых условиях в течение ряда лет. Из всей группы регенерантов были выделены линии R-07-11, R-08-18 (исходная линия Л-135-03), 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 2015-2017 годах по схеме конкурсного сортоиспытания. 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.

Урожайность семян белоцветкового, усатого, среднестебельного сорта Фараон в среднем составила 3,19 т/га (табл. 3). Урожайность белоцветковых, листочковых регенерантных линий была выше и составила 3,97 т/га у линии R – 08-18 и 4,07 т/га у линии R-07-11.

Таблица 3

**Урожайность семян регенерантных линий гороха, 2015-2017 гг.**

Сорт, линия	Селективный фактор	Урожайность, т/га			Среднее за 3 года	± к стандарту
		2015	2016	2017		
Фараон-St		3,24	2,77	3,56	3,19	
Л-135-03	контроль	3,48	3,49	4,56	3,84	+0,65
R-07-11	20% ПЭГ	3,69	3,70	4,82	4,07	+0,88
R-08-18	20% ПЭГ	3,69	3,54	4,67	3,97	+0,78
<i>HCP<sub>05</sub></i>		0,37	0,33	0,38		

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность использования селективных систем *in vitro*, моделирующих водный стресс с целью скрининга генотипов по осмоустойчивости и расширения спектра исходного материала в селекции гороха.

Не выявлено значительных отличий по осмоустойчивости между разными морфотипами. Устойчивые к осмотическому стрессу генотипы были получены как среди листочковых (Л-135-03), так и среди усатых (Л-03-109) морфотипов. Тем не менее, в среднем по группе листочковые генотипы отличались несколько большей устойчивостью к осмотическому стрессу по сравнению с безлисточковыми генотипами. Показано, что для проведения анализа устойчивости к осмотическому стрессу на клеточном уровне можно использовать каллусные ткани различного времени пассирования *in vitro*. Однако, в связи с тем, что регенерационная способность длительно пассируемых каллусов резко снижается отбор целесообразно проводить, используя молодые каллусы.

Выделены перспективные для селекции регенерантные линии R-07-11, R-08-18, превысившие оригинальные генотипы и стандарт по урожайности семян.

**Литература**

1. Manoj K. Rai, Rajwant K. Kalia, Rohtas Singh, Manu P. Gangola, A.K. Dhawan. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress // Environmental and Experimental Botany, – 2011. – V.71. – P.89-98.
2. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений, – 1999. – Т.46. – № 6. – С. 919-929.
3. Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD и ISSR-маркеров // Генетика, – 2005. – Т.41. – № 1. – С.71-77.
4. 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, – 2016. – № 1 (17). – С.6-14.
5. Новикова Н.Е. Проблемы засухоустойчивости растений в аспекте селекции гороха // Зернобобовые и крупяные культуры, 2012. – № 1. – С.53-58.
6. 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.
7. 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.

8. Соболева Г.В. Регенерация растений гороха (*Pisum sativum* L.) в культуре каллусной ткани // Зернобобовые и крупяные культуры, – 2016. – № 3 (19). – С.27-35.
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.

## SCREENING OF VARIOUS PEA MORPHOTYPES FOR RESISTANCE TO OSMOTIC STRESS IN SELECTIVE *IN VITRO* SYSTEMS

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

FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

\*FSBEI HE «OREL STATE UNIVERSITY NAMED AFTER I.S. TURGENEV»

E-mail: alniksobolev@rambler.ru

**Abstract:** Results of comparative assessment of genotypes of leafy and leafless morphotypes of pea for resistance to osmotic stress *in vitro* at the cellular level are presented. The test parameters of osmosis resistance were the growth rate of callus mass on selective media with 20% of polyethylene glycol and the ability to regenerate shoots. No significant differences in osmosis resistance between different morphotypes were revealed. Osmotic stress resistant genotypes were obtained both among leafy (L-135-03) and among leafless (L-03-109) morphotypes. However, on average, leafy genotypes were slightly more resistant to osmotic stress than leafless genotypes. In their ability to shoot from resistant calluses, the leafy morphotypes also exceeded leafless on average. It was shown that for analysis of resistance to osmotic stress at the cellular level, callus tissues of various *in vitro* passaging times can be used. However, due to the fact that the regenerative ability of long-passaged calli decreases sharply, it is advisable to carry out the selection using young calli. Regenerant lines R-07-11, R-08-18 were identified as promising for breeding, exceeding the original genotypes and the standard for seed productivity.

**Keywords:** field pea, *in vitro*, osmotic stress, callus, resistance.

DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11110

УДК 635.656:631.527

## КОЛЛЕКЦИЯ ГОРОХА – ИСТОЧНИК ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

И.С. БРАЙЛОВА, И.А. ФИЛАТОВА

ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
ЦЕНТРАЛЬНО-ЧЕРНОЗЕМНОЙ ПОЛОСЫ ИМЕНИ В.В. ДОКУЧАЕВА»

В статье представлены результаты изучения 111 коллекционных сортообразцов гороха, представленных различными эколого-географическими группами отечественной и зарубежной селекции. Исследования проводились в течение 2016-2018 гг, в соответствии с «Методикой государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур», в условиях юго-востока Центрального Черноземья. Данный селекционный материал изучался, оценивался и анализировался по ряду важнейших хозяйственноценных признаков, таких как продуктивность, устойчивость к полеганию и процентное содержание белка в зерне. В результате проделанной работы было выделено 29 образцов, отзывчивых к благоприятным гидротермическим условиям, складывающимся в период их вегетации. При средней продуктивности 602±16,0 г/делянки их урожай превышал её на 3-46 %. Самой высокой продуктивностью обладали: Темп – +105 г/дел. к стандарту, Рокет – +85 г/дел., Аз-35 – +165 г/дел., Зенит – +35 г/дел., Самариус – +25 г/дел., Consort – +65 г/дел., Д-4078/04 и Л-43/09 по 45 г/дел. В условиях засухи выделилось 11 образцов, превысивших сорт-стандарт Фокор на 12-46 %, это Рокет – +52 г/дел., Л-176/2000 – +144 г/дел., Флагман 10 – +50 г/дел., Флагман 5 – +58 г/дел., Л-525/80 – +82 г/дел., Харвус 2af – +70 г/дел., Л-25695/1 – +76 г/дел., Триумф – +90 г/дел., Мадонна – +160 г/дел., АЗМК-99 – +190 г/дел., Битюг – +70 г/дел. Одним