

УДК 635.656:581.143.6

АНАЛИЗ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ОБРАЗЦОВ ГОРОХА МОРФОТИПА ХАМЕЛЕОН В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Г.В. СОБОЛЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук, E-mail: alniksobolev@rambler.ru

А.Н. СОБОЛЕВ*, кандидат биологических наук

А.А. ЗЕЛЕНОВ**, кандидат сельскохозяйственных наук, ORCID ID: 0000-0003-4544-7845

ФГБНУ «ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР», ОРЕЛ

*ФГБОУ ВО «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИМЕНИ И.С. ТУРГЕНЕВА», ОРЕЛ

**АО «ЩЕЛКОВО АГРОХИМ», МОСКВА

В статье представлены результаты оценки образцов гороха морфотипа хамелеон по устойчивости к осмотическому стрессу в селективных системах in vitro. Материалом для исследований служили образцы: Спартак, Ягуар, Орел, Сибирский 1, ТМ-06-457, Яз-06-643, Х₂-12-90, Амих-99-1132, Wisconsin-9406. Сорта стандарты – Софья (короткостебельный, усатый тип листа) и Темп (короткостебельный, обычный тип листа). Для проведения эксперимента был использован эмбрионный каллус, полученный из верхушек 5-дневных проростков гороха. Для имитации in vitro стрессового эффекта обезвоживания использовали питательные среды, содержащие 15% ПЭГ. Уровень устойчивости оценивали по индексу роста каллуса (ИРК), определяемому как отношение конечной сырой массы каллусов на селективных средах в процентах к контролю. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования селективных систем in vitro с 15% ПЭГ для тестирования устойчивости образцов гороха к водному дефициту на клеточном уровне. Установлены генотипические различия по реакции на осмотический стресс, значение ИРК варьировало от 18,18% (Амих-99-1132) до 39,10% (Х₂-12-90). Большинство генотипов морфотипа хамелеон оказались более стресс-толерантны в сравнении с сортами-стандартами Софья и Темп. Показано, что каллусы гороха, прошедшие отбор в селективных системах in vitro сохраняют способность к регенерации побегов. Наибольшее количество регенерантных побегов получено у сортов Ягуар и Сибирский 1. На ризогенных питательных средах in vitro получены корнесобственные растения-регенеранты сортов Ягуар, Орел, Сибирский 1.

Ключевые слова: горох, морфотип, *in vitro*, каллус, осмоустойчивость, регенерация.

Для цитирования: Соболева Г.В., Соболев А.Н., Зеленев А.А. Анализ относительной засухоустойчивости образцов гороха морфотипа хамелеон в культуре *in vitro*. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2023; 2(46):28-34. DOI: 10.24412/2309-348X-2023-2-28-34

ANALYSIS OF THE RELATIVE DROUGHT TOLERANCE OF PEA SAMPLES OF THE CHAMELEON MORPHOTYPE IN *IN VITRO* CULTURE

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

FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GOAT CROPS», OREL

* FSBEI HE «I.S. TURGENEV STATE UNIVERSITY», OREL

** АО «SHCHELKOVO AGROCHEM», MOSCOW

Abstract: *The article presents the results of evaluation of chameleon morphotype pea samples for resistance to osmotic stress in in vitro selective systems. Samples served as material for*

research: Spartak, Yaguar, Orel, Sibirskii 1, TM-06-457, Yag-06-643, Kh₂-12-90, Amikh-99-1132, and Wisconsin-9406. Varieties standards – Sof'ya (short-stemmed, tendril leaf type) and Temp (short-stemmed, standard leaf type). For the experiment, we used embryogenic callus obtained from the tops of 5-day-old pea seedlings. Nutrient media containing 15% PEG were used to imitate the stress effect of dehydration *in vitro*. The level of resistance was assessed by the callus growth index (CGI), defined as the ratio of the final wet weight of calli on selective media in percent to the control. The data obtained indicate the possibility of using *in vitro* selective systems with 15% PEG to test the resistance of pea samples to water deficiency at the cell level. Genotypic differences in response to osmotic stress were established, with CGI values ranging from 18.18% (Amikh -99-1132) to 39.10% (Kh₂-12-90). Most chameleon morphotype genotypes were more stress-tolerant compared to the Sof'ya and Temp standard varieties. It has been shown that pea calluses that have passed selection in selective *in vitro* systems retain the ability to regenerate shoots. The greatest number of regenerated shoots was obtained in the varieties Yaguar and Sibirskii 1. On rhizogen nutrient media *in vitro* were obtained rootstock plants of Yaguar, Orel, and Sibirskii 1 varieties

Keywords: pea, morphotype, *in vitro*, callus, osmotolerance, regeneration.

Введение

По расчетам климатологов, в долгосрочной перспективе большая часть территории Российской Федерации будет находиться в зоне более значительного потепления по сравнению с глобальным. Следствием такого изменения климата станет увеличение частоты и продолжительности засух. При этом, область распространения засух будет только расширяться, охватывая все новые зернопроизводящие районы [1]. В тоже время установлено, что возникающие в неблагоприятные годы засухи приводят к резкому падению урожайности именно у новых высокопродуктивных сортов и гибридов, имеющих более высокий уровень энерго- массообмена. Это применимо и к новым урожайным сортам гороха зернового [2]. Поэтому, перед селекционерами стоит задача совместить в одном генотипе высокую продуктивность и засухоустойчивость, что достаточно проблематично. В этой связи, возможности роста урожайности и устойчивости к водному дефициту возлагаются на изменение архитектоники растений гороха. Основные усилия селекционеров в настоящее время направлены на создание сортов короткостебельных, детерминантных, с измененным листовым аппаратом: безлисточковых (усатых), рассеченнолисточковых, типа хамелеон (с ярусной гетерофиллией), люпиноидов [3, 4, 5]. Широкомасштабных исследований по оценке устойчивости данных генотипов к засухе не проводилось. Существующие традиционные методы позволяют, как правило, лишь дифференцировать генотипы по ряду физиологических, биохимических и других признаков, коррелирующих со способностью растений противостоять засухе. Альтернативой традиционным подходам в селекции на засухоустойчивость могут служить биотехнологические методы, такие как клеточная селекция *in vitro* [6].

Цель исследований – оценка в селективных системах *in vitro* образцов гороха морфотипа хамелеон по устойчивости к осмотическому стрессу.

Материал и методы исследований

Материалом для проведения исследований служили 9 генотипов гороха морфотипа хамелеон: Спартак, Ягуар, Орел, Сибирский 1, ТМ-06-457, Яг-06-643, Х₂-12-90, Амих-99-1132, Wisconsin-9406. Сорты стандарты – Софья (короткостебельный, усатый тип листа) и Темп (короткостебельный, обычный тип листа). Для экспериментов использовали каллусные ткани, полученные из верхушек 5-дневных стерильных проростков гороха. Оценку осмоустойчивости образцов осуществляли на селективных питательных средах *in vitro*. Основу питательных сред составляли минеральные соли согласно протоколу MS [7], витамины согласно протоколу В5 [8], мезо-инозитол – 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, сахароза – 30000 мг/л. Для имитации дефицита влаги в состав питательных сред вводили полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 (ПЭГ-6000), понижающий осмотический потенциал питательных сред, но не проникающий в клетки растений. Концентрация ПЭГ в

средах составляла 15%. Среды, содержащие ПЭГ-6000 остаются жидкими, поэтому каллусные ткани инкубировали на подложках из фильтровальной бумаги в стеклянных стаканчиках. Контроль – питательные среды без селективного фактора. Устойчивость генотипов к осмотическому стрессу оценивали по индексу роста каллуса (прирост каллуса на селективных средах в % к контролю). Продолжительность пассажа составляла 45-50 суток.

Для индукции регенерационных процессов в каллусных тканях использовали питательные среды без селективной нагрузки дополненные регуляторами роста. Для индукции ризогенеза регенерантные побеги переносили на среду с уменьшенной вдвое концентрацией минеральных солей по прописи В5 и дополненную НУК.

Приготовление питательных сред, субкультивирование каллусов проводили с использованием методик, разработанных ранее [9, 10]. Все культуры выращивали на свету при температуре 25⁰С и 16-ти часовом фотопериоде. Основные количественные показатели подвергали вариационно-статистической обработке (Б.А. Доспехов, 1985).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что на питательных средах без селективной нагрузки (контроль) рост каллусной ткани у всех изученных генотипов проходил довольно быстро, каллусы имели интенсивный зеленый цвет (табл. 1). У большинства генотипов сырая масса каллусов относительно начального веса эксплантов увеличивалась от 3,75 (Софья) до 8,70 раз (Wisconsin-9406), за исключением линий Х₂-12-90 (1,33) и Амих-99-1132 (2,53).

В условиях смоделированной *in vitro* физиологической засухи все образцы сохраняют способность к росту каллусных тканей. Однако наблюдалось значительное ингибирование роста каллусов относительно показателей контроля (рис.1). Прирост биомассы каллусов на селективных средах был в 3-5 раз ниже в сравнении с контролем. При этом наблюдалась тесная корреляция ($r=0,97$) между приростом каллусов без селективной нагрузки и в присутствии селективного фактора (15% ПЭГ). Полученные данные показали, что по степени чувствительности к присутствию ПЭГ в питательной среде изученные генотипы различались как между собой, так и в сравнении с сортами стандартами. Значение индекса роста каллуса (ИРК) варьировало от 18,18 до 39,10%.

Таблица 1

Сравнительная оценка *in vitro* сортов и селекционных линий гороха морфотипа хамелеон по устойчивости к осмотическому стрессу

№ п/п	Образец	Относительный прирост каллуса		Индекс роста каллуса, %
		MS (контроль)	MS + 15% ПЭГ	
1	Спартак	4,51	1,42	31,49
2	Ягуар	3,15	1,02	32,38
3	Орел	7,59	2,63	34,65
4	Сибирский 1	6,36	1,73	27,20
5	ТМ-06-457	8,50	2,85	33,53
6	Яг-07-643	6,58	2,46	37,39
7	Х ₂ -12-90	1,33	0,52	39,10
8	Амих-99-1132	2,53	0,46	18,18
9	Wisconsin-9406	8,70	2,82	32,51
10	Софья- St	3,75	0,95	25,33
11	Темп-St	8,22	2,33	28,35

Наибольшую резистентность к осмотическому стрессу продемонстрировали образцы Х₂-12-90, Яг-07-643, у которых ИРК составил 39,10% и 37,39% соответственно. Наиболее чувствительной к осмотическому стрессу оказалась селекционная линия Амих-99-1132 (ИРК=18,18%). Сравнительный анализ показал, что большинство генотипов морфотипа хамелеон по относительной устойчивости к осмотическому стрессу превосходили как сорт стандарт Софья (ИРК=25,33%), так и сорт стандарт Темп (ИРК=28,35%). Также было

установлено, что несмотря на то, что сорта Софья (усатый тип листа) и Темп (обычный тип листа) значительно различались по способности к недифференцированному росту соматических тканей без селективной нагрузки, по устойчивости к водному дефициту оказались примерно на одном уровне.

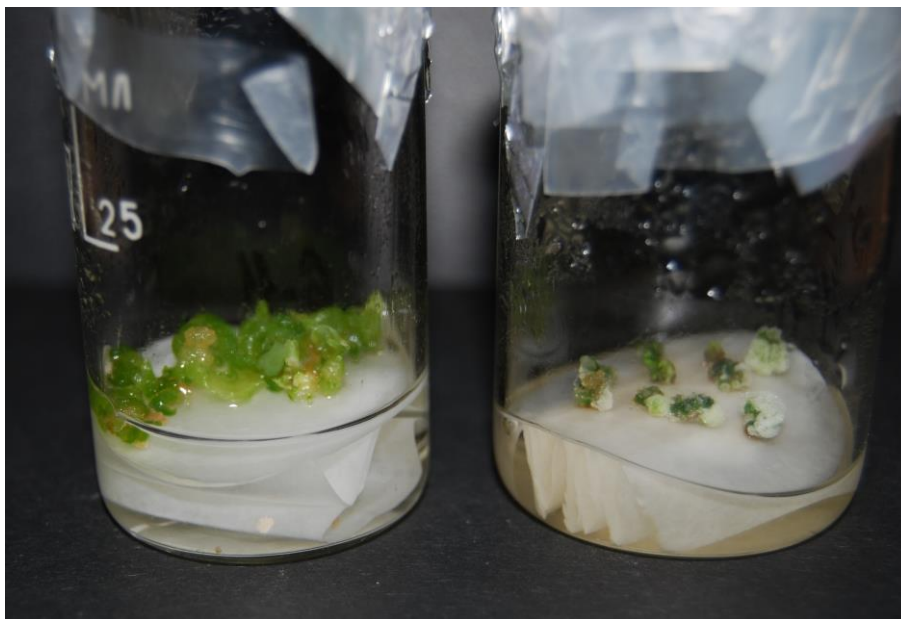


Рис. 1. Влияние осмотического стресса на рост калусных тканей сорта Орел (слева – контроль, справа – 15 % ПЭГ)

Анализ результатов показал отсутствие взаимосвязи ($r=0,17$) между способностью к недифференцированному росту каллусов в контроле и устойчивостью образцов к водному дефициту в условиях *in vitro*, оцениваемому по ИРК.

Использование биотехнологий должно быть основано не только на тестировании генотипов по устойчивости к осмотическому стрессу на клеточном уровне, но важное значение также имеет и сохранение ими высокой способности к побегообразованию и получению растений-регенерантов. Сохранившиеся после клеточной селекции *in vitro* каллусы переносили на питательные среды для индукции побегообразования. Результаты показали, что каллусные клоны морфотипа хамелеон, отселектированные в условиях водного дефицита сохраняют способность к морфогенезу и индукции побегообразования (рис. 2).



Рис. 2. Регенерация побегов в культуре осмоустойчивых каллусов

Для индукции побегообразования в каллусных тканях наиболее эффективной оказалась питательная среда содержащая: минеральные соли по протоколу MS, витамины, согласно протоколу B5, мезо-инозитол – 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, сахарозу – 30000 мг/л, агар – 6000 мг/л, БАП – 5,0 мг/л, НУК – 2,0 мг/л. Регенерация побегов из осмоустойчивых каллусов была достигнута у большинства изученных генотипов (табл. 2).

Таблица 2

Результаты формирования регенерантных побегов из осмоустойчивых каллусов гороха и эффективность ризогенеза

№ п/п	Образец	Число			Эффективность ризогенеза, %
		Посаженных каллусов	Выживших каллусов	Регенерантных побегов	
1	Спартак	30	16	0	0
2	Ягуар	30	28	33	48,48
3	Орел	30	20	22	40,91
4	Сибирский 1	30	22	33	45,45
5	ТМ-06-457	30	21	21	0
6	ЯГ-07-643	30	23	11	0
7	X ₂ -12-90	30	25	8	0
8	Амих-99-1132	30	15	0	0
9	Wisconsin-9406	30	25	15	0

Не удалось получить регенерантные побеги у образцов Спартак и Амих-99-1132, в связи с тем, что каллусные клоны в процессе субкультивирования на морфогенных средах погибли. Возможно, это связано с отложенным эффектом влияния селективного фактора.

Установлено, что способность к формированию регенерантных побегов определяется не только комбинацией регуляторов роста, но и в значительной степени зависит от генотипа. Максимальное (33 шт.) число побегов сформировалось у сортов Ягуар и Сибирский 1. У образцов ЯГ-07-643, X₂ -12-90, Wisconsin-9406 наблюдалось образование достаточно большого числа микропобегов, которые в дальнейшем не росли так и оставаясь в зачаточном состоянии. Поэтому, несмотря на большое число сохранившихся морфогенных каллусов, число хорошо сформировавшихся побегов было невысоким. В ходе эксперимента наблюдался высокий уровень витрификации побегов. Это негативно сказалось на решении вопросов ризогенеза. В общей сложности по всей группе образцов было получено 143 морфологически нормально сформировавшихся побега. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии прямой связи между способностью образцов к недифференцированному росту соматических тканей в селективных условиях *in vitro* и эффективностью регенерации побегов.

Для дорастивания образовавшихся микропобегов и нивелирования влияния высоких концентраций цитокинина использовали питательные среды, содержащие 1,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л ИМК.

Индукцию ризогенеза у регенерантных побегов осуществляли на питательной среде *in vitro*, которая включала минеральные соли и витамины среды B5, с уменьшенной вдвое концентрацией основных компонентов и дополненная НУК 1,0 мг/л. Корнесобственные растения-регенеранты R₀ были получены у сортов Ягуар, Орел и Сибирский 1, эффективность ризогенеза которых составила 48,48%, 40,91% и 45,45% соответственно. Период формирования корней у регенерантных побегов составлял от 30 до 45 суток. У гороха как у двудольного растения в норме формируется стержневая корневая система. В процессе индукции ризогенеза *in vitro* у регенерантных побегов наблюдалось образование от 3 до 10 корней на побег (рис. 3 А).

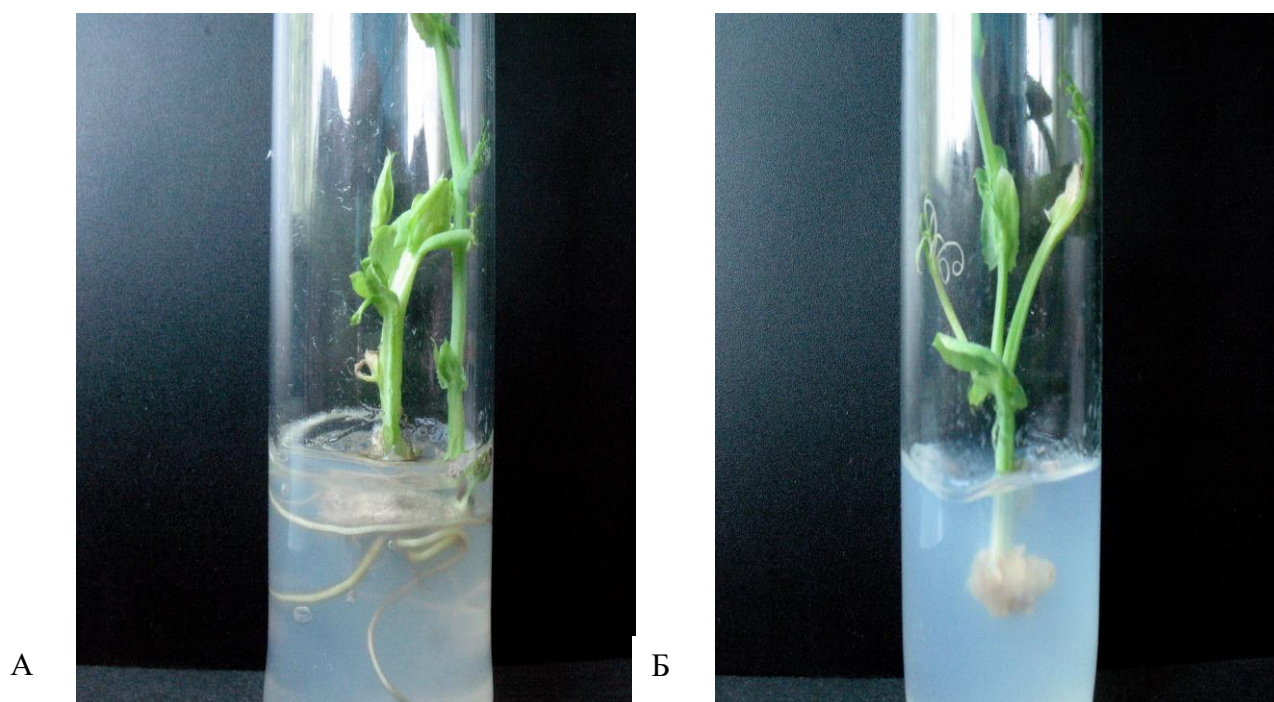


Рис. 3. Характер ризогенеза у регенерантных побегов гороха
(А – ризогенез у регенерантных побегов, Б – разрастание базальной части побега)

Длина корней колебалась от 1 до 8 сантиметров. Корневые волоски не образовывались. Увеличение концентрации НУК выше 1,5 мг/л приводило, как правило, к разрастанию базальной части побега и образованию так называемой «пятки» (рис. 3 Б). При этом корни или не образовывались, или были тонкими, слабыми, легко обламывающимися при извлечении из среды.

Растения с образовавшимися корнями извлекали из пробирок, отмывали от питательной среды и на сутки помещали в стаканчики с водой. Затем регенерантные растения R_0 высаживали в вегетационные сосуды с почвой в теплице. Однако получить семенное потомство не удалось, так как растения не прижились в условиях *in vitro*. В связи с этим необходимо проведение дополнительных исследований по изучению вопросов ризогенеза и адаптации растений-регенерантов гороха к почвенным условиям.

Заключение

Согласно анализу полученных результатов, можно сделать заключение о возможности дифференциации генотипов гороха морфотипа хамелеон по устойчивости к водному дефициту на клеточном уровне *in vitro* на селективных питательных средах, имитирующих засуху (15% ПЭГ). Выявлены генотипические различия по реакции на осмотический стресс. Показатель ИРК у образцов изменялся от 18,18 до 39,10%. Практически все изученные образцы гороха морфотипа хамелеон оказались более стресс-толерантными в сравнении с сортами-стандартами Софья и Темп. Показано, что каллусные клоны прошедшие отбор *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу сохраняют способность к морфогенезу и регенерации побегов. Высокой интенсивностью побегообразования характеризовались сорта Ягуар и Сибирский 1. Установлено, что наиболее сложным этапом при разработке селективной системы является процесс ризогенеза у регенерантных побегов. Несмотря на достаточно большое количество регенерантных побегов получить корнесобственные растения-регенеранты R_0 удалось лишь у сортов Ягуар, Орел и Сибирский 1, эффективность ризогенеза которых составила 48,48%, 40,91% и 45,45% соответственно. Результаты эксперимента показали, что по комплексу показателей: реакция каллусов на осмотический стресс, способность к регенерации побегов и индукции ризогенеза наибольшей устойчивостью к водному дефициту *in vitro* характеризовались сорта Ягуар и Орел.

Литература

1. Ксенофонов М.Ю., Ползиков Д.А. К вопросу о влиянии климатических изменений на развитие сельского хозяйства России в долгосрочной перспективе // Проблемы прогнозирования, – 2020. – № 3. – С. 82-92.
2. Амелин А.В., Чекалин Е.И. Адаптивные способности растений гороха и их изменения в результате селекции // Зернобобовые и крупяные культуры, – 2019. – № 2 (30). – С. 4-14. DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11081
3. Зотиков В.И., Полухин А.А., Грядунова Н.В., Сидоренко В.С., Хмызова Н.Г. Развитие производства зернобобовых и крупяных культур в России на основе использования селекционных достижений // Зернобобовые и крупяные культуры, – 2020. – № 4 (36). – С. 5-17. DOI: 10.24411/2309-348X-2020-11198.
4. Зеленев А.Н., Зеленев А.А. Сто лет орловской селекции гороха. Итоги и перспективы // Зернобобовые и крупяные культуры, – 2022. – № 2 (42). – С. 41-59. DOI: 10.24412/2309-348X-2022-2-41-59.
5. Sinjushin, A.; Semenova, E.; Vishnyakova, M. Usage of Morphological Mutations for Improvement of a Garden Pea (*Pisum sativum*): The Experience of Breeding in Russia. // *Agronomy*, 2022, 12, 544. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030544>
6. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection –An overview of the recent progress // *Environmental and Experimental Botany*, 2011. – V.71. –P.89-98
7. 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.
8. 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.
9. Соболева Г.В. Регенерация растений гороха (*Pisum sativum* L.) в культуре каллусной ткани // Зернобобовые и крупяные культуры, – 2016. – № 3 (19). – С. 27-35.
10. 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.

References

1. Ksenofontov M.Yu., Polzikov D.A. K voprosu o vliyaniy klimaticheskikh izmeneniy na razvitie sel'skogo khozyaistva Rossii v dolgosrochnoi perspektive [On the issue of the impact of climate change on the development of Russian agriculture in the long term]. *Problemy prognozirovaniya*, 2020, no.3, pp.82-92. (In Russian)
2. Amelin A.V., Chekalin E.I. Adaptivnyye sposobnosti rasteniy gorokha i ikh izmeneniya v rezul'tate selektsii [Adaptive abilities of pea plants and their changes as a result of breeding.] *Zernobobovyye i krupyanye kul'tury*, 2019, no.2(30), pp. 4-14, DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11081. (In Russian)
3. Zotikov V.I., Polukhin A.A., Gryadunova N.V., Sidorenko V.S., Khmyzova N.G. Razvitie proizvodstva zernobobovykh i krupyanykh kul'tur v Rossii na osnove ispol'zovaniya selektsionnykh dostizheniy [Development of the production of legumes and groat crops in Russia based on the use of breeding achievements]. *Zernobobovyye i krupyanye kul'tury*, 2020, no.4(36), pp. 5-17. DOI: 10.24411/2309-348X-2020-11198. (In Russian)
4. Zelenov A.N., Zelenov A.A. Sto let orlovskoi selektsii gorokha. Itogi i perspektivy [One Hundred Years of Oryol Pea Breeding. Results and prospects] *Zernobobovyye i krupyanye kul'tury*, 2022, no.2(42), pp. 41-59. DOI: 10.24412/2309-348X-2022-2-41-59. (In Russian)
5. Sinjushin, A.; Semenova, E.; Vishnyakova, M. Usage of Morphological Mutations for Improvement of a Garden Pea (*Pisum sativum*): The Experience of Breeding in Russia. *Agronomy*, 2022, 12, 544. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030544>
6. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection -An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, V.71, pp.89-98
7. Murashige N., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, V.15, no.13, pp.473-497.
8. Gamborg O.L., Constabel F., Shyluk I.P. Organogenesis in callus from shoot apical of *Pisum sativum* L., *Physiologia Plantarum*, 1974, V.30, pp.125-128.
9. Soboleva G.V. Regeneratsiya rasteniy gorokha (*Pisum sativum* L.) v kul'ture kallusnoi tkani [Regeneration of pea plants (*Pisum sativum* L.) in callus tissue culture]. *Zernobobovyye i krupyanye kul'tury*, 2016, no.3(19), pp.27-35. (In Russian)
10. Soboleva G.V., Suvorova G.N., Kondykov I.V., Zotikov V.I. Metod kletochnoi selektsii gorokha na ustoichivost' k abioticheskim faktoram sredy (metodicheskie rekomendatsii) [Method of cellular breeding of peas for resistance to abiotic environmental factors (guidelines)]. Moscow, 2011, 25p. (In Russian)