



РОЛЬ ГЕНОТИПА РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

ROLE OF PEA GENOTYPE IN TISSUE CULTURE PROPAGATION

Ключевые слова: горох, морфотипы, влияние генотипа, культура тканей, микроклональное размножение.

Представлены результаты исследований влияния генотипа растений гороха на способность к микроразмножению в условиях культуры тканей. Исследования ряда ученых выявили внутривидовую изменчивость различных генотипов гороха по способности к новообразованиям на эксплантах. Анализ различных генотипов гороха по регенерационной способности показал, что характер регенерации зависит не только от тканевой принадлежности эксплантов, но и от генотипа. В наших экспериментах влияние генотипа в культуре тканей выразилось в различном морфологическом развитии микроклонов. В условиях культуры тканей при микроразмножении у генотипов № 1065-02, Амур, Зенит наблюдались активный рост и развитие растений. Количество побегов на 1 растение находилось в пределах 2-6 шт. Растения характеризовались более высокой степенью развития, побеги были утолщенные, кустистые. Коэффициент размножения достигал 5. В условиях *in vitro* микроклоны данных генотипов соответствовали морфологическим характеристикам растений, выращенных в полевых условиях. Сорта гороха Рамонский 77 и АМЗК-99 высокорослые, имеют среднюю облиственность, относятся к обыкновенному и детерминантному морфотипу, соответственно. В условиях культуры тканей данные растения активно росли в высоту. Их средняя высота находилась в пределах от 3 до 7 см. Количество побегов на одно растение не превышало 1-3 шт., коэффициент размножения составлял 2. Таким образом, при микроразмножении гороха четко прослеживается роль генотипа. Наиболее высокий выход хорошо развитых микроклонов с одного

введенного растения обеспечивают низкорослые (короткостебельные) и усатые генотипы.

Keywords: pea, morphotypes, effect of genotype, tissue culture, microclonal propagation.

The research findings of pea plant genotype influence on micropropagation ability in tissue culture are discussed. A number of researchers revealed intraspecific variability of different pea genotypes in terms of new growth ability in explants. The analysis of regenerative ability of different pea genotypes shows that regeneration pattern depends not only on explant tissue type but also on the genotype. In our experiments in tissue culture the influence of the genotype was expressed in different morphological development of microclones. At micropropagation in tissue culture, active growth and development of plants was observed in the genotypes No. 1065-02, Amur and Zenit. The number of shoots per 1 plant ranged from 2 to 6. The plants showed higher degree of development, the shoots were thicker and bushy. The propagation coefficient amounted to 5. Under *in vitro* culture conditions the microclones of those genotypes corresponded to the morphological characteristics of the plants grown under field conditions. The pea varieties Ramonskiy 77 and AMZK-99 are tall with medium number of leaves and belong to ordinary and determinant morphotype respectively. Under tissue culture conditions, those plants actively grew in height. Their average height was in the range from 3 to 7 cm. The number of shoots per 1 plant did not exceed 1-3, and the propagation coefficient was 2. Therefore, the genotype role in micropropagation of peas was clearly shown. Low (short-stemmed) and tendrill plant genotypes ensure the greatest yield of well-developed microclones per one introduced plant.

Сашченко Мария Николаевна, к.б.н., н.с., отдел генетики и биотехнологии, Всероссийский НИИ сахарной свёклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, Воронежская обл. Тел.: (47340) 5-33-27. E-mail: samani84@mail.ru.

Sashchenko Mariya Nikolayevna, Staff Scientist, Genetics and Biotechnology Division, All-Russian Research Institute of Sugar-Beet named after A.L. Mazlumov of Rus. Acad. of Agr. Sci., Voronezh Region. Ph.: (47340) 5-33-27. E-mail: samani84@mail.ru.

Введение

Ростовые процессы растений в условиях *in vitro* в значительной мере определяются внутренними и внешними факторами. К внутренним факторам относятся: видовая принадлежность исходного материала, генотипические особенности растений, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта. Внешние лимитирующие факторы – условия куль-

тивирования, прежде всего гормональная нагрузка питательной среды.

Исследования отечественных и зарубежных ученых выявили важную роль генотипа в управлении процессами роста и морфогенеза в условиях *in vitro* [1]. Установлено, что пасленовые, крестоцветные, зонтичные растения легче индуцируют каллусную ткань и органо-генез, тогда как бобовые и злаковые намного труднее ввести в культуру тканей [2]. Осо-

бенно сложно в этом случае получить из каллуса растения – регенеранты.

Видовая принадлежность растения оказывает существенное влияние на процессы каллусообразования, потенциальные возможности каллуса к дальнейшему пассируемому росту и разным типам морфогенеза. Исследователями установлены различия в способности к образованию каллуса между различными видами люцерны, томатов, овса, хлопчатника, гречихи, кукурузы, гороха и ряда других видов.

Однако внутри вида отмечены существенные отличия. Одинаковые по возрасту и тканевой принадлежности первичные экспланты отличались по частоте каллусообразования в зависимости от исходного генотипа.

При изучении разных по генотипу растений ячменя показана зависимость инициации и интенсивности роста каллусов от генотипа исходных растений.

Изучение каллусо- и органоогенеза у сортов риса показало, что все сорта резко различаются по способности к органоогенезу.

Исследования ученых в разные годы выявили внутривидовую изменчивость различных генетических форм гороха по способности к новообразованиям на эксплантах [3]. Был проведен анализ различных генотипов гороха по способности к регенерации. Показано, что характер регенерации зависит не только от тканевой принадлежности эксплантов, но и от генотипа. Изученные сорта и линии гороха различались по способности к органоогенезу при одинаковых условиях культивирования *in vitro*. По всем показателям каллусообразования сорта в значительно меньшей степени различались по признакам регенерации, чем линии. Явные отличия были выявлены по типу каллуса. Это свидетельствует о генетической обусловленности морфогенетических особенностей культивируемой ткани и о возможности отбора генотипов, характеризующихся повышенными морфогенетическими потенциалами. Отмечено, что причинами внутривидовой изменчивости гороха по признакам регенерации на среде без гормонов являются различия в их гормональном статусе. Аналогичные результаты были получены на капустных [4].

Анализ регенерационной способности различных видов пшеницы, эгилопса и кукурузы также показал существенные различия по интенсивности каллусогенеза и регенерации растений [5].

Роль генотипа в проявлении морфогенной способности культивируемыми тканями изучена на хлопчатнике, картофеле, люцерне, ячмене, луке и других культурах.

В экспериментах на сахарной свекле влияние генотипа выразилось в различной морфогенетической потенции исходных форм, т.е. различной способности верхушечных мери-

стем к индукции заложения адвентивных почек, регенерации нормально развитых побегов, росту и развитию эксплантов в культуре тканей [6]. Таким образом, роль генотипа при культивировании свеклы *in vitro* очевидна, и следует признать, что в настоящее время не всегда удается создать для любого генотипа условия культивирования, индуцирующие процессы регенерации и пролиферации побегов. Аналогичная тенденция наблюдается и при микроклональном размножении других культур.

Установлено, что генотип растений – доноров был одним из основных факторов, влияющих на эмбриоидогенез у всех исследованных видов рода *Brassica*, где применялась культура пыльников и микроспор [7].

В результате исследований, проведенных Е.Б. Котляровой, выявлена способность растений – доноров ярового рапса определять дальнейшее развитие неоплодотворенных семязачатков [8]. Развитие эксплантов шло по пути образования каллуса с последующей регенерацией ростовых почек. Аналогичные результаты были получены у других культур, например, у риса, герберы, картофеля, кориандра, лаванды и шалфея мускатного.

По мнению многих ученых, генотип растения – один из наиболее эффективных факторов, оказывающих влияние на выход гаплоидных растений в культуре репродуктивных органов. Не только внутри рода, но и сорта одних и тех же видов обнаруживают при культивировании неоплодотворенных семязачатков различную способность растений к регенерации.

При этом возникающие различия на всех этапах получения растений в культуре *in vitro* и каждая ступень имеет свою генетическую основу. Зависимость формирования гаплоидов от генотипа исходной формы в культуре неоплодотворенных семяпочек показана для большинства изучаемых культур. Отмечая важную роль генотипа, некоторые исследователи склонны даже считать, что генотип является главным лимитирующим фактором при получении растений через культуру тканей [9].

Ученые отмечали в своих исследованиях, что формирование новых структур из неоплодотворенных семяпочек сахарной свеклы в условиях *in vitro* происходило почти на всех изучаемых генотипах, но направление морфогенетического развития семяпочек (эмбриоидогенез или каллусогенез) и частота возникновения регенерантов определялись генотипом [10].

Наряду с прочими важными факторами, влияющими на процесс микроклонального размножения, существенным остается генотип исходного растения, в наибольшей степе-

ни влияющий на морфогенетический потенциал экспланта в условиях *in vitro*.

Известно, что способность к размножению *in vitro*, как и любой признак растительного организма, обусловлен и в сильной степени варьирует у различных видов и сортов.

Цель исследований была направлена на изучение влияния генотипа растений гороха

разных морфотипов на процесс микроклонирования в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследований

Исследования проводились на шести сортообразцах гороха, различающихся по морфобиологическим признакам (табл. 1).

Таблица 1

Морфологическое описание изучаемых генотипов

Показатель	Рамонский 77	377-02	Амур	Зенит	АМЗК-99	1065-02
Разновидность	vulgare					
Морфотип	Обыкновенный	Низкорослый, узколиственный	Короткостебельный	Усатый короткостебельный	Детерминантный	Усатый низкорослый
Высота растения, см	60-80 и более	55-65	50-70	50-70	70-90	70-85
Стебель	Простой, светло-сизозеленый	Прочный, темно-зеленый	Прочный, темно-зеленый	Обычный, зеленый	Обычный, зеленый	Прочный, темно-зеленый
Лист	Сложный				Сложный	
	С 2-3-4 парами яйцевидных, светло-зеленых листочков, прилистники средние, полусердцевидные, облиственность средняя, усики на конце листа	С 2-3 парами темно-зеленых листочков, яйцевидные, средние, узкие, с сизым налетом, прилистники средние, полусердцевидные, облиственность средняя, усики на конце листа	С 2-3-4 парами темно-зеленых, яйцевидных, средних, цельно-крайних листочков, прилистники средние, полусердцевидные, полноразвитые, облиственность средняя	Безлисточковый тип, зеленые усики, прилистники средние, сердцевидные, зеленые, с восковым налетом на верхней стороне	С 2-3 парами темно-зеленых листочков, яйцевидные, средние, цельно-крайние, прилистники средние, полусердцевидные, облиственность средняя, усики на конце листа	Безлисточковый тип, зеленые усики, прилистники средние, сердцевидные, зеленые, с восковым налетом на верхней стороне
Число междоузлий, шт.	12-18	15-17	13-16	16-22	12-14	11-13
Соцветие	Двухцветковая кисть					
Боб	Прямой, слабоизогнутый, с тупой верхушкой, средний (4 см), 3-7 семянной	Прямой, средний (5-6 см), с тупой верхушкой, 3-4-5 семянной	Прямой, реже изогнутый, средний (5-6 см), с тупой верхушкой, 4-5-7 семянной	Прямой, средний (5-6 см), с тупой верхушкой, 3-4-5 семянной	Прямой, слабоизогнутый, с тупой верхушкой, средний (4-6 см), 3-4 семянной	Прямой, средний (5-6 см), с тупой верхушкой, 3-4-5 семянной
Число бобов, шт.	5-9	4-8	8-13	11-17	5-8	7-12
Семена	От светло-желтых до желто-розовых, округлые, гладкие	Розовые, округлые, реже овальные, гладкие, матовые	Желто-розовые, округло-овальная, гладкие, матовые	Желтые, округло-овальные, гладкие, матовые	Розовые, округлые, реже овальные, гладкие, матовые	Розовые, круглые, гладкие, матовые
Вегетационный период, дни	86	82	84	84	80	82
Посев-всходы	13	12	13	12	12	12
Всходы-цветение	39	38	38	40	38	38
Цветение-спелость	37	32	36	34	33	34
Начало цветения-конец цветения	14	9	11	12	6	12
Устойчивость (5 баллов - к засухе)	3	4	4	4	4	4
- к заморозкам	2	2	2	2	2	2
- к болезням	3	3	3	3	3	3
- к полеганию	1	2	2	5	2	5
- к опаданию/растрескиванию бобов	3/3	4/4	5/4	5/4	5/4	5/4

В качестве эксплантов для введения в культуру тканей использовали зрелые семена. Стерилизацию эксплантов проводили 0,05%-ным раствором Ломаксхлора с экспозицией 60 мин. Культивирование растений осуществлялось на питательной среде с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (MS) и фитогормонами БАП 0,5 мг/л, ИМК 0,1 мг/л, витаминами по Уайту с добавлением сахарозы, приготовленной по общепринятым методикам, в оптимальных условиях при $t = +23-25^{\circ}\text{C}$, 16-часовом фотопериоде.

Результаты и их обсуждение

В экспериментах, проведенных нами на горохе, влияние генотипа в культуре тканей выразилось в различном морфологическом развитии микроклонов. Аналогичные данные были получены Л.А. Лутовой с другими соавторами в 1994 г.

В условиях культуры тканей при микро-размножении у генотипов № 1065-02, Амур, Зенит наблюдались активный рост и развитие растений, их высота варьировала от 2 до 6 см (табл. 2).

Таблица 2

Влияние генотипа на рост и развитие микроклонов

Генотип	Высота, см	Количество побегов на 1 раст., шт.	Коэффициент размножения
Рамонский-77	3-7	1-2	2
377-02	2-5	2-6	5
Амур	2-6	2-5	4
Зенит	2-5	2-6	4
АМЗК-99	3-7	1-3	2
1065-02	2-5	2-3	3

Количество побегов на 1 растение находилось в пределах 2-6 шт. Растения характеризовались более высокой степенью развития, побеги были утолщенные, кустистые. Коэффициент размножения достигал 5.

В полевых условиях растения этих генотипов не превышают в высоту 70 см и относятся к короткостебельному (Амур, Зенит) и низкорослому (№ 377-02, № 1065-02) морфотипу. Зенит и № 1065-02 характеризуются безлисточковым, усатым типом. Селекционный номер 377-02 является узколистым. В условиях *in vitro* микроклоны данных генотипов соответствовали морфологическим характеристикам растений, выращенных в полевых условиях (рис. 1).

Сорта гороха Рамонский 77 и АМЗК-99 высокорослые (до 90 см), имеют среднюю облиственность, относятся к обыкновенному и детерминантному морфотипу соответственно. В условиях культуры тканей растения данных сортотипов активно росли в высоту. Их средняя высота находилась в пределах от 3 до 7 см. Количество побегов на одно рас-

тение не превышало 1-3 шт., коэффициент размножения составлял 2 (рис. 2).



А



Б



В

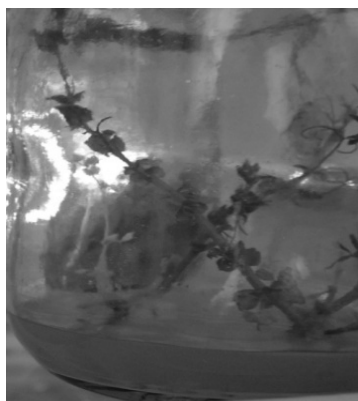


Г

Рис. 1. Внешний вид микроклонов изучаемых генотипов: А – Амур; Б – Зенит; В – № 377-02; Г – № 1065-02



А



Б

Рис. 2. Внешний вид микроклонов сортов: А – Рамонский 77; Б – АМЗК-99

Таким образом, при микроразмножении гороха четко прослеживается роль генотипа. Наиболее высокий выход хорошо развитых микроклонов с одного введенного растения обеспечивают низкорослые (короткостебельные) и усатые генотипы.

Следует отметить, что развитие растений и скорость размножения также определялись генотипическими особенностями материала (табл. 3).

Таблица 3

Результаты микроразмножения разных генотипов гороха

Селекционный материал	Получено микроклонов, шт.		
	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж
Рамонский 77	40	75	130
377-02	34	120	315
Амур	35	112	273
Зенит	38	118	280
АМЗК-99	41	74	144
1065-02	35	105	287

Рост и развитие микроклонов линий 377-02, 1065-02 и сортов Зенит, Амур происходили активно, что позволило после 3-го пассажа получить 315, 287, 280 и 273 растения соответственно. Высокорослые (Рамонский 77) и детерминантные (АМЗК-99) генотипы имели достаточную активность размножения в условиях *in vitro*. Так, после 3-го пассажа все сорта имели достаточное количество размноженного материала.

Выводы

В результате исследований отмечено влияние генотипа растений гороха на способность к микроразмножению в условиях культуры тканей. Показано, что наиболее высокий выход хорошо развитых микроклонов с одного введенного растения обеспечивают низкорослые (короткостебельные) и усатые генотипы Рамонской селекции.

Библиографический список

1. Кучеренко Л.А. Подходы к разработке технологии массовой регенерации растений *in vitro* // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 232-243.
2. Ежова Т.А., Багрова А.М., Гостимский С.А. Побегообразование в каллусах из верхушек стеблей, междоузлий и листьев различных генотипов гороха // Физиология растений. – 1985. – Т. 32. – Вып. 3. – С. 513-520.
3. Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.О. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // Генетика. – 1994. – Т. 30. – № 8. – С. 1065-1074.
4. Ockendon D.J., Sutherland R.A. Genetic and non-genetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) // Theor. Appl. Genet. – 1987. – Vol. 74 (5). – P. 566-570.
5. Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы. Морфогенез и толерантность // Физиология растений. – 1994. – Т. 41. – № 6. – С. 807-814.
6. Знаменская В.В. Принципы и методы создания и поддержания исходного материала на современном этапе селекции сахарной свеклы: дис. ... докт. с.-х. наук. – Рамонь, 1999. – 317 с.
7. Burnett L., Yarrow S., Huang B. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *Oleifera* // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11 (4). – P. 215-218.
8. Котлярова Е.Б. Аспекты применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.): дис. канд. биол. наук. – Липецк, 2007. – 128 с.
9. Sitbon M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture unfertilized ovules // Agronomie. – 1981. – Vol. 1 (9). – P. 807-812.
10. Подвигина О.А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы: дис. докт. с.-х. наук. – Воронеж, 2003. – 277 с.

References

1. Kucherenko L.A. Podkhody k razrabotke tekhnologii massovoi regeneratsii rastenii in vitro // Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya rastenii. – M.: Nauka, 1991. – S. 232-243.
2. Ezhova T.A., Bagrova A.M., Gostimskii S.A. Pobegoobrazovanie v kallusakh iz verkhushkek stebel, mezhdouzlii i list'ev razlichnykh genotipov gorokha // Fiziologiya rastenii. – 1985. – T. 32. – Vyp. 3. – S. 513-520.
3. Lutova L.A., Bondarenko L.V., Buzovkina I.S., Levashina E.A., Tikhodeev O.N., Khodzhaiova L.T., Sharova N.V., Shishkova S.O. Vliyanie genotipa rasteniya na regeneratsionnye protsessy // Genetika. – 1994. – T. 30. – № 8. – S. 1065-1074.
4. Ockendon D.J., Sutherland R.A. Genetic and non-genetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmifera) // Theor. Appl. Genet. – 1987. – Vol. 74 (5). – P. 566-570.
5. Karabaev M.K., Dzhardemaliev Zh.K. Kul'tiviruemye kletki pshenitsy i kukuruzy. Morfogenez i tolerantnost' // Fiziologiya rastenii. – 1994. – T. 41. – № 6. – S. 807-814.
6. Znamenskaya V.V. Printsipy i metody sozdaniya i podderzhaniya iskhodnogo materiala na sovremennom etape selektsii sakharnoi svekly // dis. ... dokt. s.-kh. nauk. – Ramon', 1999. – 317 s.
7. Burnett L., Yarrow S., Huang B. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *Oleifera* // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11 (4). – P. 215-218.
8. Kotlyarova E.B. Aspekty primeneniya metodov biotekhnologii v selektsii yarovogo rapsa (*Brassica napus* L.) // dissertatsiya kandidata biol. nauk. – Lipetsk, 2007. – 128 s.
9. Sitbon M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by in vitro culture unfertilized ovules // Agronomie. – 1981. – Vol. 1 (9). – P. 807-812.
10. Podvigina O.A. Teoreticheskoe obosnovanie i priemy ispol'zovaniya metodov biotekhnologii v selektsii sakharnoi svekly // dissertatsiya doktora s.-kh. nauk. – Voronezh, 2003. – 277 s.



УДК 631.8:633.11 (571.15)

Т.Г. Хижникова, Н.В. Чернецова
T.G. Khizhnikova, N.V. Chernetsova

ИЗМЕНЕНИЕ ПЛОЩАДИ ЛИСТЬЕВ, ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ПРОДУКТИВНОСТИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА ФОНЕ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

THE CHANGE OF LEAF AREA, PHOTOSYNTHETIC POTENTIAL AND SPRING WHEAT PRODUCTIVITY AGAINST THE BACKGROUND OF SEED INOCULATION WITH BACTERIAL PREPARATIONS

Ключевые слова: яровая пшеница, площадь листьев, фотосинтетический потенциал, продуктивность, биопрепарат, инокуляция семян, погодные условия, минеральные удобрения, сорт, корреляция.

Наряду с минеральными и органическими удобрениями в сельском хозяйстве широкое применение находят бактериальные препараты. Использование бактериальных препаратов на основе несимбиотических ассоциативных бактерий оказывает всестороннее действие на рост и развитие растений в течение вегетации. Исследования с применением биопрепарата «Биоплант – К» проводились в условиях умеренно засушливой колочной степи Алтайского края в течение четырех лет. Объекты исследования – три сорта яровой мягкой пшеницы селекции Алтайского НИИ сельского хозяйства (Алтайская 98, Алтайская 105, Алтайская 325), различающиеся по спелости. Продуктивность культуры определяют такие показатели, как площадь листьев и фотосинтетический потенциал.

Максимальное развитие площади листьев при обработке семян перед посевом биопрепаратом наблюдалось в фазу колошения у сорта Алтайская 105 (50 тыс. м²/га) и Алтайская 325 (41,4 тыс. м²/га), у сорта Алтайская 98 листовой аппарат активно работал в фазу кущения. Фотосинтетический потенциал тесно коррелирует с урожайностью. Существенное влияние на данный показатель оказывают несимбиотические ассоциативные азотфиксирующие бактерии, особенно в засушливые годы. Биологическая урожайность, в среднем за четыре года, при использовании «Биопланта – К», составила у сортов Алтайская 105 – 5,2 т/га, Алтайская 98 – 4,2, Алтайская 325 – 3,9 т/га. Превышение к контролю доходило до 30,0-55,6%. Установлено, что обработка семян пшеницы перед посевом биопрепаратом «Биоплант – К» обеспечивает высокие показатели продуктивности растений, что важно в засушливых условиях отдельных периодов вегетации, характерных для Алтайского края.