

Получение растений-регенерантов *Medicago varia* индукцией каллусообразования листовых эксплантов в культуре *in vitro*

Н.С. Строева, В.Г. Дарханова

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Исследованы особенности каллусообразования *in vitro* листовых эксплантов сортообразца *Medicago varia* Сюлинская, апробированы условия для получения растений-регенерантов из эмбриогенных каллусных тканей. Индукция каллусных клеток из листовых эксплантов осуществлялась в присутствии в питательной среде 2,4 Д-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), кинетина и нафтилуксусной кислоты (НУК). Соматические клетки дифференцировались в эмбриональные в присутствии высокой концентрации ауксинов – по 8 мг/л 2,4-Д и кинетина; НУК – 5 мг/л на модифицированной питательной среде Гамборга В5. Каллус формировался вдоль надрезов и постепенно покрывал всю поверхность площади экспланта, имел желтый цвет, плотную консистенцию и зернистую структуру. При пассировании полученных каллусов на свежую агаризованную питательную среду Гамборга В5 (+10 г/л сахарозы + 4 г/л бактоагара, с добавлением БАП (0,2 мг/л)) стимулировалось развитие в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых формировались почки и эмбриониды. Получены растения-регенеранты люцерны из эмбрионидов и почек с использованием питательной среды В5 и ½ В5 без фитогормонов для дальнейшего развития и укоренения.

Ключевые слова: *Medicago varia*, ауксины: 2,4-Д, НУК, цитокинины: БАП, кинетин, фитогормоны, каллусогенез, каллусная ткань, морфогенез, соматические клетки, эмбриониды, растения-регенеранты.

In vitro Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Medicago varia*

N.S. Stroevea, V.G. Darhanova

Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Yakutsk

The features of callus formation *in vitro* from leaf explants of *Medicago varia* Syulinskaya variety are investigated and conditions for plant regeneration from embryogenic callus tissue are tested. The induction of callus cells from leaf explants was carried out in the presence of a nutrient medium D 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4 - D), kinetin and naphthaleneacetic acid (NAA). Somatic cells differentiated to embryonic in the presence of a high concentration of auxin - 8 mg/l 2,4 - D and kinetin; NAA - 5 mg/l in the modified Gamborg B5 medium. Callus formed along the incisions and gradually covered the entire surface of the explant area. It had a yellow color, dense texture and grain structure. Passaging the derived callus on fresh agar Gamborg B5 medium (10 g/l sucrose + 4 g/l of bactoagar supplemented with BAP (0.2 mg/l), stimulated the development into callus tissue cells of meristematic and embryonic types which formed the buds and embryoids. The regenerated plants of *M. varia* from embryoids and buds are obtained for further development and rooting.

Key words: *Medicago varia*, auxins, 2,4-D, NAA, cytokinins, BAP, kinetin, plant hormones, callusogenesis, callus tissue, morphogenesis, somatic cells, embryoids, regenerated plants.

Введение

Люцерна изменчивая Сюлинская была выведена в Институте северного луговодства АН РС(Я).

Сортообразец обладает всеми необходимыми данными, чтобы занять достойное место в севооборотах сельскохозяйственных земледельческих предприятий республики [1].

Получение нового материала для селекционного улучшения сортообразца актуально для сельского хозяйства и животноводства республики. Исследования с использованием методов изолированной культуры тканей в селекции лю-

СТРОЕВА Наталья Семеновна – н.с., nataly.stroevea.62@mail.ru; ДАРХАНОВА Валентина Гаврильевна – н.с., darhana@mail.ru.

церны являются новым направлением в условиях Якутии. Люцерна относится к числу немногих сельскохозяйственных растений, для которых определены основные условия культивирования тканей и клеток, обеспечивающие высокий выход регенерантов [2].

Регенерация растений в культуре соматических тканей происходит благодаря свойству тотипотентности растительной клетки [3]. Результат культивирования зависит от баланса фитогормонов, типа экспланта, минерального состава среды, физических условий и длительности инкубации, способности вида или сорта к регенерации и других факторов [4, 5].

Вместе с тем культура изолированных тканей все больше находит применение в решении вопросов прикладного характера. Общеизвестно успешное применение культуры *in vitro* для размножения растений, оздоровления и производства посадочного материала, для создания новых форм и сортов [6].

Цель исследования – получение растений-регенерантов посредством индукции каллусогенеза и регенерации в культуре *in vitro* листовых эксплантов люцерны изменчивой сортотипа Сюлинская.

Материалы и методы

В качестве исходного экспериментального материала были использованы семена люцерны Сюлинская, относящейся по комплексу признаков к виду *Medicago varia* Mart. – люцерна изменчивая. Род люцерна *Medicago* L. принадлежит семейству бобовых – *Fabaceae* Lindl. (*Leguminosae* Juss., *Papilionaceae* Giseke). Сортотип Сюлинская характеризуется зимостойкостью, скороспелостью, засухоустойчивостью, холодостойкостью, высокой технологичностью благодаря прямостоячей форме куста. Урожайность сена в пределах 40–50 ц/га без орошения, урожайность семян в условиях криолитозоны достаточно высока – 1,5–2,5 ц/га [1].

В работе использовали методы культуры клеток и тканей в асептических условиях, рекомендованные О.А. Рожанской и Е.А. Свеженцевой [7]. Все методы *in vitro* предусматривают выполнение трех главных требований: стерильность, питательная среда, контролируемые внешние условия (свет, температура, влажность). Работы по культивированию тканей проводились в ламинар-боксе (БОВ-001-АМС (вариант «СЛШ»), Россия), затем сосуды с тканями переносили в культуральную комнату. Культивирование проводили при освещенности 3–4 тыс. лк и 16-часовом фотопериоде, температуре 24 ± 1 °C, влажности воздуха 70%.

Для создания оптимальных условий, способствующих индукции каллусообразования в

культуре *in vitro* листовых эксплантов *Medicago varia*, клеток эмбрионального типа и получения растений-регенерантов были использованы методические рекомендации А.В. Мезенцева [2]. Реализация этого метода включает несколько этапов, с применением на каждом из них соответствующей питательной среды: получение асептических проростков – культивирование изолированных сегментов проростков (эксплантов) до образования каллусов – индукция соматического эмбриогенеза и почек – получение растений-регенерантов.

Использовалась агаризованная питательная среда Гамборга В5 с добавлением ауксинов: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 1-нафтилуксусной кислоты (НУК), цитокининов: кинетина (Кин) и 6-бензиламинопурина (БАП). Экспланты листьев получали из пробирочных растений люцерны, выращенных на среде 1/2В5 из стерильных семян. В опытах с каллусом использовали ткань, поддерживаемую в культуре в течение шести месяцев. После образования корней растения-регенеранты высаживали в смесь почвы и песка в соотношении 3:1.

Результаты и их обсуждение

Известно, что для получения каллусов используют полностью развитые, неповрежденные листья различного возраста [2]. На первом этапе нами для индукции каллусогенеза были использованы тройчатые листья проростков люцерны, выращенных в пробирках из стерильных семян. Тройчатые листья разделяли на листочки и делали на каждом из них ряд надрезов по всей площади листовой пластинки. Затем их помещали на модифицированную среду В5 с 15 г/л сахарозы, в которой увеличивали в три раза концентрацию хелата железа (111 мг/л $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ и 84 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), добавляли нитрат аммония (250 мг/л) и фитогормоны: 2,4-Д и кинетин по 8 мг/л, НУК 0,5 мг/л, которые индуцировали процесс дедифференцировки клеток листовой ткани и способствовали пролиферации каллуса (рис. 1).



Рис.1. Экспланты листьев люцерны *in vitro*

Материал инкубировали в течение 30 дней. Первые 6–7 дней листовые экспланты оставались зелеными, постепенно светлея и утолщаясь, затем вдоль разрезов возникала каллусная ткань. На начальном этапе каллус бледно-желтого цвета имеет рыхлую, средней плотности, однородную структуру. Затем формировалась светлая, желтовато-зеленая, влажная, мягкая каллусная ткань (таблица).

Получение каллусной ткани
и регенерация растений *Medicago varia*

Среда с добавками, мг/л	Экспланты	Результат
1/2 В5	Семена	Семядоли, побеги, апексы
В5 + 2,4-Д 8+Кин 8 + НУК 0,5	Листья	Каллус
В5 + БАП 0,2	Каллус	Каллус, эмбриоды, почки, регенерация
В5	Эмбриоды, почки	Развитие и рост побегов
1/2В5	Побеги	Растения-регенеранты с корнями

При пассировании полученных каллусов на свежую среду В5 с добавкой 10 г/л сахарозы, 4 г/л бактоагара, БАП 0,2 мг/л продолжалась пролиферация ткани, изменялась консистенция и морфология. Эта среда стимулировала развитие клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых после многократных делений формируются почки и эмбриоды (таблица).

Через три недели, вследствие интенсивной пролиферации, образовывались хорошо развитые каллусы, которые состояли из однородной, более или менее рыхлой, светлой (от светло-желтой до светло-зеленой) ткани морфогенного типа (рис. 2).

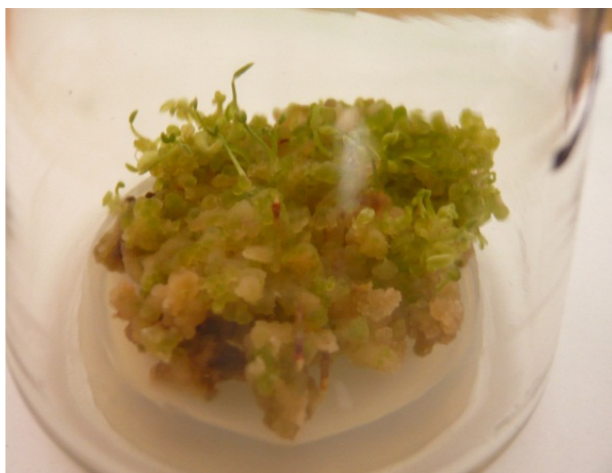


Рис 2. Морфогенная каллусная ткань и эмбриоды

Известно, что от соотношения фитогормонов в питательной среде зависит тип морфогенеза в культуре ткани. Их локальное соотношение в среде является определяющим в развитии типов дифференцированных структур на каллусах одного происхождения [2]. В наших экспериментах наблюдалось одновременное образование зеленых почек и эмбриодов. У побегов, возникших из почек, появляются сразу тройчатые листья. В отличие от них, у побегов эмбрионного происхождения первые листья – простые, как у семенного проростка (рис. 2).

При субкультивировании эмбриодов и почек на свежую среду В5 без гормонов в течение 2–3 недель из них формировались растения-регенеранты (таблица, рис. 3).



Рис. 3. Регенерация в каллусной культуре люцерны

Для дальнейшего развития побеги переносили в колбы со средой 1/2В5 без гормонов. Через 2–3 недели регенеранты достигали высоты 6–7 см. Растения с хорошо развитыми корнями извлекали из пробирок и переносили в почвенный субстрат для адаптации к условиям фитотрона.

Полученные из каллуса растения-регенеранты являются исходным материалом для использования в селекционно-генетических программах по улучшению хозяйственно-ценных признаков люцерны с применением методов биотехнологии. Кроме того, растения-регенеранты могут использоваться для изучения феномена соматической изменчивости, а также при создании сложногогибридных популяций.

Представленная работа – сообщение о получении побегов в культуре каллусной ткани люцерны изменчивой сортобразца Сюлинская, произрастающей в условиях Центральной Якутии. Дальнейшие исследования будут направлены на усовершенствование схемы культивирования, изучение соматической изменчивости растений-регенерантов и отбор образцов с высоким морфогенетическим потенциалом.

Выводы

Установлен состав питательных сред для каллусообразования и регенерации растений в культуре *in vitro* листовых эксплантов *Medicago varia*, сортообразец Сюлинская. Индукция каллусогенеза происходит на модифицированной питательной среде Гамборга В5 в присутствии высокой концентрации фитогормонов: по 8 мг/л 2,4-Д и кинетин, с добавкой 0,5 мг/л НУК. Каллус формируется вдоль надрезов и постепенно покрывает всю поверхность экспланта, имеет желтую окраску, плотную консистенцию и зернистую структуру. Индукция стеблевого морфогенеза и эмбриоидогенеза происходит при пассировании каллусов на свежую среду В5 с добавлением БАП (0,2 мг/л). В каллусной ткани возникают клетки меристематического и эмбрионального типа, из которых формируются почки и эмбриониды. После переноса на безгормональные среды В5 и ½ В5 происходит дальнейшее развитие и укоренение растений-регенерантов люцерны.

Работа выполнена в рамках проекта НИИР № 0376–2014–002. Тема 52.1.11 «Разнообразие растительного мира таежной зоны Якутии: структура, динамика, сохранение».

Литература

1. Денисов В.Г., Стрельцова В.С. Люцерна в Якутии. Новосибирск, 2000. 198 с.
2. Мезенцев А.В. Методические указания по регенерации и размножению люцерны с использованием культуры тканей, клеток и протопластов. М., 1980. 25 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
4. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М.: Наука, 1975. С. 1–50.
5. Рожанская О.А. Особенности регуляции морфогенеза эспарцета и люцерны *in vitro* / О.А. Рожанская, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева, К.Г. Королев, О.И. Ломовский // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2008. №5. С. 58–65.
6. Муравлев А. А. Методические рекомендации по получению растений *in vitro* из соматической ткани рапса / А.А. Муравлев, М.В. Баевская, О.П. Стрижак, А.Е. Фомина // Кормопроизводство. 2010. № 9. С. 3–7.
7. Рожанская О.А., Свеженцева Е.А. Получение и отбор соматических вариаций для селекции рапса: Метод. рекомендации / СО РАСХН. СибНИИкормов. Новосибирск, 1991. С. 7–18.

Поступила в редакцию 08.09.2016

УДК 581.6 (524.441)

К продуктивности растительных сообществ арктических тундр о-ва Большой Ляховский (Новосибирские острова, Якутия)

Е.Г. Николин

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск
Государственный природный заповедник Усть-Ленский МПР и Э России, г. Якутск

Приведены данные по продуктивности растительных сообществ арктических тундр о-ва Большой Ляховский (Новосибирские острова). Исследование проведено методом укосов. Запас надземной фитомассы в растительности равнинных ландшафтов северо-восточной оконечности острова по усредненным показателям варьирует в пределах от 60,3 до 700,4 г/м², а на локальных участках достигает 1501,5 г/м². При значениях выше 150 г/м² наибольшую фитомассу формируют мхи, доля которых составляет 70–90 %. Масса кормовых растений в мелкобугорковых тундрах при максимальных значениях не превышает 86,8 г/м². Более высока доля кормовой фракции в сообществах байджараховых комплексов на приморских лугах и приморских тундровых луговинах, что обеспечивается в основном за счет сосудистых растений. Лишайники и макроводоросли, как компоненты рациона питания диких растительноядных животных, могут учитываться лишь в качестве сопутствующего корма летнего периода. Местами кормовое значение имеет *Salix polaris*.

Ключевые слова: арктические тундры, продуктивность растительных сообществ, фитомасса, кормовые растения, о-в Большой Ляховский, Новосибирские острова.