

бобовых и крупяных культур. – № 2000131785/13; заявл. 18.12.00; опубл. 10.11.02.

5. Зернобобовые культуры: учеб. пособие для вузов / Д. Шпаар и др. – Минск: ФУАинформ, 1980. – 221 с.

6. Способ возделывания фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* L. в условиях резко континентального климата при капельном орошении: пат. 2415555 Рос. Федерация: МПК-8:A01G1/00/ Зволинский В.П.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Прикаспийский научно-исследовательский институт аридного земледелия Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009115770/21; заявл. 24.04.09; опубл. 10.04.11, Бюл. № 10.

7. Bilanshi, W. Mechanical properties of soybeans // *Vysoke Skoly v Praze*. – 1985. – № 1. – S. 45-50.

References

1. Shpaar D. Zernobobovye kul'tury. – Minsk: FAUinform, 2000. – 264 s.

2. Gurkina M.V. Otsenka kollektсионnykh obraztsov ovoshchnoi fasoli i vydelenie istochnikov tsennykh priznakov dlya selektsii v aridnoi zone Nizhnego Povolzh'ya: avtoref. dis. ... kand. s.-kh. nauk. – Astrakhan', 2009. – 26 s.

3. Pavlenko V.N. Nauchnye osnovy tekhnologii vozdelvaniya i uborki bobovykh kul'tur v usloviyakh nizhnego Povolzh'ya: dis. ... kand. t. nauk: 06.01.01: zashchishchena 22.01.12: utv. 15.07.12. – Astrakhan', 2012. – С. 202-205.

4. Sposob poseva fasoli: pat.2192110 Ros. Federatsiya: МПК7: A01S 7/00, A01V 79/00 / Letunovskii V.I., Akulov A.S.; заявитель i patentoobladatel' Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii institut zernobobovykh i krupyanykh kul'tur. – Zayavka № 2000131785/13; заявл. 18.12.00; opubl. 10.11.02.

5. Zernobobovye kul'tury: ucheb. posobie dlya vuzov / D. Shpaar i dr. – Mn.: FUAinform, 1980. – 221 s.

6. Sposob vzdelyvaniya fasoli obyknovnoi *Phaseolus vulgaris* L. v usloviyakh rezko kontinental'nogo klimata pri kapel'nom oroshenii: pat. 2415555 Ros. Federatsiya: МПК-8:A01G1/00/ Zvolinskii V.P.; заявитель i patentoobladatel' Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie Prikaspiiskii nauchno-issledovatel'skii institut aridnogo zemledeliya Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk. – № 2009115770/21; заявл. 24.04.09; opubl. 10.04.11, Byul. № 10.

7. Bilanshi W. Mechanical properties of soybeans // *Vysoke Skoly v Praze*. – 1985. – № 1. – S. 45-50.



УДК 635.65:575:581.14

М.Н. Сащенко, О.А. Подвигина
M.N. Sashchenko, O.A. Podvigina

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

PECULIARITIES OF PEA PLANT DEVELOPMENT DURING MICROCLONAL PROPAGATION *IN VITRO* CULTURE CONDITIONS

Ключевые слова: микроклонирование, горох, культура тканей, стерилизующий агент, жизнеспособность, питательная среда, фитогормоны, размножение, укоренение.

Результаты проведенных исследований явились основанием для усовершенствования метода клонального размножения на основе прямой регене-

рации гороха в условиях *in vitro*. Были разработаны параметры стерилизации эксплантов гороха при введении в условия *in vitro*, включающие в себя обработку зрелых семян 0,05%-ным раствором помаксхлора при экспозиции в течение 60 мин. Данная схема обработки обеспечивает стерильность материала на уровне 90%. Оптимальной для микроразмножения гороха оказалась

питательная среда на основе Мурасиге, Скуга (MS) с половинной нормой минеральных солей и гормональным комплексом, содержащим 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК или ИМК в концентрации 0,1 мг/л. Для укоренения микроклонов гороха в культуре *in vitro* оптимальным фитогормоном является нафтилуксусная кислота в концентрации 1,5 мг/л. При разработке новых селекционных программ по созданию высокопродуктивных сортов гороха рекомендуется использовать данный метод биотехнологии для ускоренного размножения и сохранения оригинального селекционного материала.

Keywords: *micro-cloning, pea, tissue culture, sterilizing agent, viability, nutrient medium, phytohormones, propagation, rooting.*

Pea is one of the most important leguminous plants in the world. Further pea breeding development requires the introduction of new biotechnological methods enabling fast propagation of certain lines and varieties. The research goal was to improve the method of microclonal propagation under *in vitro* culture. The varieties and lines (Ramon selection) developed at the All-Russian Research Institute of Sugar Beet were used as starting

material. The explants were sterilized with disinfectant solutions at different concentrations and expositions. The plants were cultivated under optimal conditions. The results of the conducted investigations gave the grounds to improve the clonal propagation method based on direct pea regeneration under *in vitro* conditions. The parameters of pea explants' sterilization by placing them under *in vitro* conditions including treatment of mature seeds with 0.05% Lumax-Chlor solution for 60 minutes were developed. This treatment procedure ensures sterility of material at the level of 90%. The nutrient medium based on Murashige and Skoog (MS) medium with one-half standard of mineral salts, hormonal complex containing 6-benzylaminopurine at concentration of 0.5 mg L and indoleacetic acid or indolebutyric acid at concentration of 0.1 mg L proved to be optimal for pea micropropagation. For pea microclones rooting under *in vitro* culture, the optimal phytohormone is naphthylacetic acid at concentration of 1.5 mg L. Based on the obtained data, the procedure of pea propagation has been modified; the procedure may by half reduce the time needed for selective breeding process to develop and introduce new varieties with less labour costs.

Сашченко Мария Николаевна, н.с., отдел генетики и биотехнологии, Всероссийский НИИ сахарной свёклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, Воронежская обл. Тел.: 920-427-29-40. E-mail: samani84@mail.ru.

Подвигина Ольга Анатольевна, д.с.-х.н., зам. директора по научной работе, Всероссийский НИИ сахарной свёклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, Воронежская обл. 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.: 920-427-29-40. E-mail: samani84@mail.ru.

Podvigina Olga Anatolyevna, Dr. Agr. Sci., Deputy Director for Research, All-Russian Research Institute of Sugar Beet named after A.L. Mazlumov of Rus. Acad. of Agr. Sci., Voronezh Region. E-mail: samani84@mail.ru.

Введение

Одной из важнейших зернобобовых культур в мире является горох. Основное направление в селекции данной культуры – создание новых сортов, обладающих высокой урожайностью, устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам, повышенным содержанием белка [1]. Дальнейшее развитие селекции гороха требует внедрения в работу новых методов биотехнологии, позволяющих повысить эффективность селекции за счет создания новых форм с ценными признаками, длительного сохранения отдельных ценных генотипов и гибридов, а также ускорения отдельных этапов селекции путем быстрого размножения необходимых линий и сортов [2].

Работы по применению методов биотехнологии в селекции гороха немногочисленны. Ведутся исследования по изучению устойчивости к стрессовым факторам (засуха, засоление), технике и условиям клонирования бобовых культур [3], получению регенерантов из каллусов, обеспечивающих широкое разнообразие исходных форм [4], применению

генетической трансформации на горохе [5, 6].

Вместе с тем исследования по культивированию органов и тканей очень ограничены и свидетельствуют о недостаточной изученности морфогенетических свойств растений [7]. Исследование особенностей онтогенеза гороха, продолжительности фенологических фаз, выявление связей между внешней формой и экзогенными воздействиями факторов среды служат успешному ведению селекционных работ [8].

Методические рекомендации по микроклонированию растений гороха в культуре ткани *in vitro* были предложены В.А. Внучковой в 1988 г. Однако разработанная методика оказалась громоздкой и не нашла широкого применения. В связи с этим возникает потребность в разработке и совершенствовании различных методов биотехнологии, позволяющих создавать новый и сохранять ценный селекционный материал в культуре изолированных органов и тканей такой важной культуры, как горох.

Цель – усовершенствование метода микрореклонального размножения гороха в культуре *in vitro*.

В соответствии с целью исследований были поставлены **задачи**:

- подобрать стерилизующий агент, оказывающий наиболее эффективное обеззараживающее действие на вводимый эксплант, и определить его оптимальную концентрацию;
- определить оптимальные составы питательных сред для роста, развития и дальнейшего укоренения регенерантов гороха.

Материалы и методы исследований

В качестве эксплантов для введения в культуру тканей использовали зрелые семена, проростки из термостата различных сортов гороха Рамонской селекции. Стерилизацию эксплантов проводили растворами веществ: Domestos, Мертиолят, Ломаксхлор, Белизна, Анолит. Вещества использовались в разных концентрациях с экспозицией 60-90 мин. Культивирование растений осуществлялось на питательной среде с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (MS) с различным сочетанием и концентрацией фитогормонов, витаминами по Уайту с добавлением сахарозы, приготовленной по общепринятым методикам [9], в оптимальных условиях при $t = +23-25^{\circ}\text{C}$, в 16-часовом фотопериоде.

Результаты и их обсуждение

Выбор экспланта и разработка схемы стерилизации. Проведенными исследованиями выявлено, что успех введения в культуру тканей определяется эффективностью стерилизации. Как показал сравнительный анализ действия различных стерилизующих агентов, использование хлорсодержащих веществ обеспечивало достаточную стерильность материала.

В результате наших исследований установлено, что при обработке семян хлорамином Б в концентрации 5-10% и экспозиции 30, 60, 90 стерильность эксплантов не превышала 20%, наблюдалась грибная и бактериальная инфекция около эксплантов (рис. 1 А). У проростков формировались недоразвитые корешки и листики (рис. 1 Б).

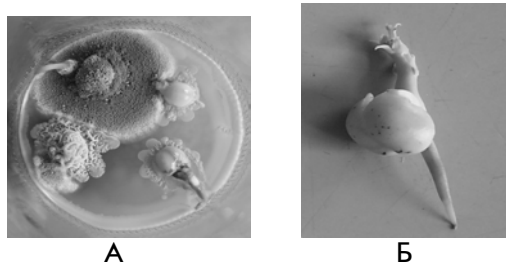


Рис. 1. Инфицированность эксплантов (А), проросток на 5-7-й день (Б) после обработки хлорамином Б

Жизнеспособность стерильных регенерантов была низкой. Повышение концентрации до 8 и 10% вызывало ожог тканей у 25-100% эксплантов. Стерильность вводимого материала от 20 до 40% обеспечивала обработка семян гороха анолитом в течение 30, 60, 90, 120 мин. Отмечено хорошее развитие эксплантов. Длина корешка достигала 4-8 см, наличие многочисленных боковых корешков, проростки имели насыщенную зеленую окраску, утолщенный стебель и достигали 5-6 см в высоту. Совместное применение анолита и католита также не позволило получить высокой степени стерильности эксплантов (рис. 3).

Растения имели низкую жизнеспособность и погибали через 7-10 дней. Увеличение концентрации до 15% и времени экспозиции до 90 мин. приводило к некротизации тканей семян и гибели проростков.

Использование белизны в концентрации 2-6% при экспозиции семян 30-60 мин. обеспечивало получение от 5 до 37% стерильности эксплантов (рис. 2).

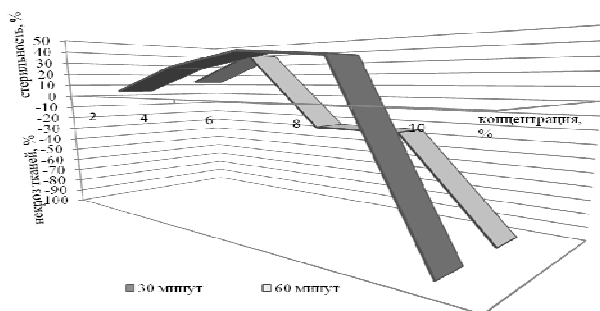


Рис. 2. Стерилизующий эффект препарата «Белизна»

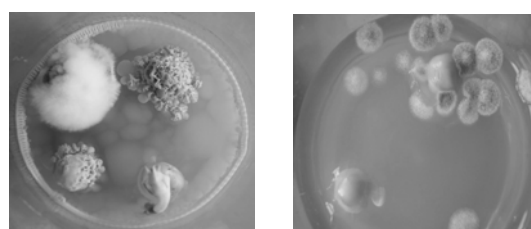


Рис. 3. Смешанная, бактериальная и грибная инфекция после обработки эксплантов раствором анолита

Изучение в качестве стерилизующего вещества ртути содержащего препарата «Мертиолят» в концентрации 0,01 и 0,02% выявило его высокую эффективность. Стерильность материала удалось повысить до 90%. Однако при дальнейшем культивировании эксплантов было отмечено ингибирующее действие Мертиолята на проростки гороха (рис. 4).

При обработке семян доместосом в течение 30 мин. на всех вариантах концентраций была отмечена тенденция роста стерильно-

сти. Так, при обработке семян 5-, 7-, 10- и 15%-ным раствором доместоса стерильность составила 5, 10, 80 и 87% соответственно (рис. 5).

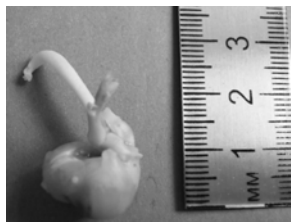


Рис. 4. Внешний вид проростков после стерилизации эксплантов раствором мертиолята

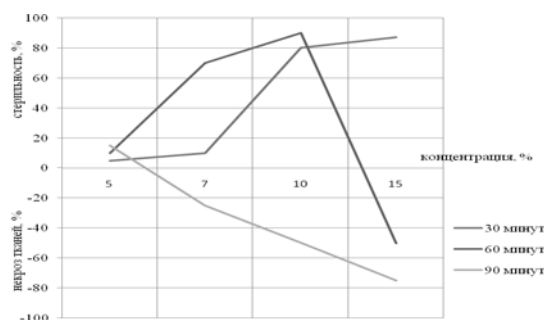


Рис. 5. Влияние концентрации доместоса и времени обработки на стерильность эксплантов

Испытание хлорсодержащего препарата «Ломаксхлор» в концентрации 0,0075 и 0,015% на всех вариантах экспозиции не дало положительных результатов, инфицированность материала составила 100% (рис. 6).

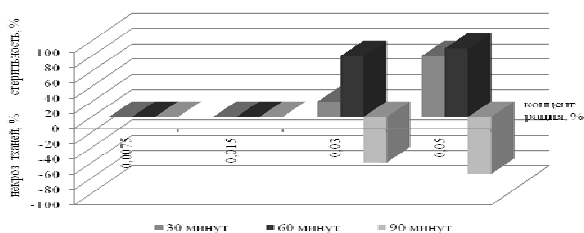


Рис. 6. Стерилизующий эффект ломаксхлора

Увеличение концентрации до 0,03% позволило получить 80% стерильных эксплантов при обработке 60 мин. Стерильность материала при обработке 30 мин. не превысила 20%. При увеличении времени экспозиции до 90 мин (концентрация 0,03%) наблюдался некроз тканей у 60% эксплантов. Наиболее высокий стерилизующий эффект был отмечен при применении ломаксхлора в концентрации 0,05% и времени экспозиции 30 и 60 мин. Стерильность эксплантов составила 80-90% соответственно. Аномалий в развитии проростков не наблюдалось.

Разработка метода стерилизации проростков, полученных в условиях термостата, изучаемыми веществами (хлорамин Б – 10%-ный раствор, ломаксхлор – 0,03-0,05%-ный раствор, белизна – 4-6%-ный раствор, доместос – 10%-ный раствор, анолит, мертиолят – 0,01%-ный раствор) при экспозиции 30, 60 и 90 мин., положительного эффекта не дала (рис. 7). Экспланты на питательной среде имели 100%-ную инфицированность.

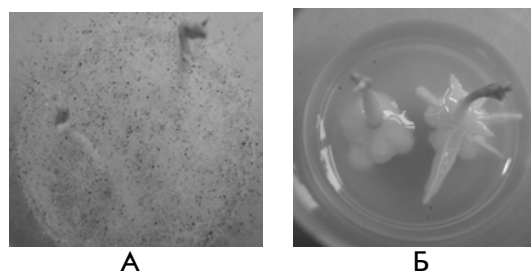


Рис. 7. Наличие инфекции на эксплантах после термостата: А – грибная; Б – бактериальная

Использование всех изучаемых веществ для стерилизации апикальных верхушек растений гороха, выращенного в условиях закрытого грунта, показало, что только ломаксхлор в концентрации 0,05% при экспозиции 30 и 60 мин. обеспечивал стерилизацию материала на уровне 60 и 85% соответственно. На всех остальных вариантах стерильность эксплантов не превышала 15%. В большинстве случаев наблюдался некроз тканей.

Таким образом, в результате исследования были разработаны параметры стерилизации эксплантов гороха при введении в условия *in vitro*, включающие в себя обработку апикальных меристем вегетирующих растений или зрелых семян 0,05%-ным раствором ломаксхлора при экспозиции в течение 60 мин. Данная схема обработки обеспечивает стерильность материала на уровне 90%.

Влияние состава питательной среды. Для работы была взята питательная среда с минеральной основой Мурасиге, Скуга (MS). Проведенные исследования показали, что добавление в среду кинетина в концентрации 1,0; 1,5; 2,0 мг/л действовало угнетающе на микроклоны – через 1,5-2 недели наблюдались пожелтение и некроз тканей. Увеличение содержания 6-БАП от 1,0 до 2,0 мг/л в сочетании с ИУК, ИМК, НУК по 0,1 мг/л отрицательно влияло на рост и развитие растений гороха. Замена ауксинов на гиббереллин (0,1 мг/л) не вызывала быстрой гибели растений, но и роста отмечено не было. Микроклоны в течение 3-6 недель оставались без изменения.

Наличие в питательной среде небольшого количества 6-БАП в сочетании с различными ауксинами и гиббереллином выявило положительный эффект. Оптимальной оказалась концентрация 6-БАП 0,5 мг/л, обеспечивающая в течение 3-6 недель культивирования формирование многочисленных боковых побегов и выживаемость растений на уровне 80,4-96,2%.

Сочетание гормонов 6-БАП + НУК (среда № 3) способствовало слабому росту растений, их высота не превышала 6 см, образование боковых побегов не отмечалось. Добавление к 6-БАП гиббереллина стимулировало рост регенерантов и образование боковых побегов – 1-2 шт./растение, при этом коэффициент размножения не превышал 2 (рис. 8 А).

Наилучшими вариантами оказались среды с 6-БАП (0,5 мг/л) + ИМК / ИУК (0,1 мг/л), где отмечались активный рост и формирование хорошо развитых боковых побегов (до 6) с короткими (до 0,5 см) междоузлиями (рис. 8 Б).



Рис. 8. Внешний вид микроклонов на питательной среде № 3 (А), № 5 (Б)

Дальнейшее увеличение концентрации 6-БАП до 1,0-2,0 мг/л при наличии прежних гормонов ожидаемого результата не дало. Растения после 2-3 недель культивирования выглядели слабыми, активно развивался некроз тканей, а затем гибель.

На безгормональной среде (контроль) регенеранты после 1-2 недель культивирования достигали высоты 2-5 см, при дальнейшем культивировании рост растений останавливался из-за отсутствия гормонов (рис. 9).

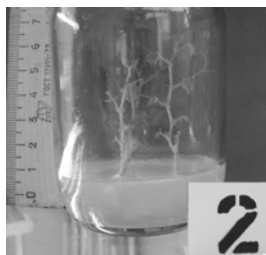


Рис. 9. Внешний вид регенерантов на среде без гормонов

Образование боковых побегов не отмечалось, коэффициент размножения был равен 1. Таким образом, оптимальной для микроразмножения гороха оказалась питательная среда на основе Мурасиге, Скуга (MS) с половинной нормой минеральных солей и гормональным комплексом, содержащим 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК или ИМК в концентрации 0,1 мг/л.

Укоренение регенерантов в условиях *in vitro*. Полученный и размноженный в культуре *in vitro* селекционный материал необходимо укоренить для дальнейшего его использования в селекционном процессе. Укоренение образовавшихся в культуре *in vitro* растений связано с индуцированием адвентивных корней, которое достигается изменением гормонального состава питательной среды.

Проведенные нами исследования на горохе показали, что стимулирующее влияние на корнеобразование оказывала нафтилуксусная кислота в концентрации 0,5 мг/л. Количество укоренившихся эксплантов составляло 30% (количество введенных эксплантов на каждый вариант составляло 60 шт.). Среднее число корней было равно 1-2 шт., размер составлял 1-2 см, высота растений колебалась от 2 до 4 см. Было отмечено, что увеличение концентрации НУК до 1,0 мг/л в питательной среде активизировало рост надземной части растений после образования корней, однако выход укоренившихся регенерантов равнялся 15%. Максимальное образование корней (42%) вызывала НУК в количестве 1,5 мг/л, среднее число корней было равно 2-3 шт., размер составлял 2-3 см. Высота растений колебалась от 3 до 5 см (рис. 10).



Рис. 10. Укоренившееся в культуре тканей растение гороха

Однако еще большее увеличение содержания гормона в среде (НУК 2,0 мг/л) оказывало негативное влияние на рост и развитие эксплантов, образование корней снизилось до 2%. Добавление в питательную среду гормонов ИУК, НУК + ИУК, ИМК желаемых результатов не оказало. На контроле укоренившихся регенерантов не наблюдалось.

Следовательно, для укоренения микроклонов гороха в культуре *in vitro* оптимальным фитогормоном является нафтилуксусная кислота в концентрации 1,5 мг/л.

Таким образом, на основании полученных данных был модифицирован метод микроклонального размножения гороха, включающий этапы стерилизации эксплантов, их введение в условия *in vitro*, собственно размножение и укоренение регенерантов. В результате исследований были размножены две селекционно-ценные по ряду признаков линии (№ 377-02, № 1065-02). Данный материал был передан селекционерам для проведения гибридизации и создания форм гороха с новыми признаками, что может способствовать ускорению процесса создания и внедрения новых сортов в два раза при меньших затратах труда и времени.

Библиографический список

1. Амелина К.В. Создание и оценка нового селекционного материала продовольственного гороха в Рамони // Инновации в свеклосахарном производстве: сб. науч. тр., посвящ. 90-летию ГНУ ВНИИСС Россельхозакадемии. – Воронеж, 2012. – С. 157-165.
2. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве / под ред. Л.Д. Колосовой, Е.В. Дайнеко. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993. – 241 с.
3. Суворова Г.Н., Бобков С.В., Соболева Г.В. Технологии клонирования зернобобовых и крупяных культур: метод. реком. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 20 с.
4. Соболева Г.В. Биотехнологические технологии получения регенерантных растений гороха *in vitro* // Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений. – Орел, 2006. – Ч. 2. – С. 185-194.
5. Нифонтова С.Н., Симоненко Ю.В., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Получение трансгенных растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.), устойчивых к гербициду Pursuit // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39. – № 2. – С. 16-21.
6. Bean S.J., Gooding P.S., Mullineaux P.M., Davies D.R. A simple system for pea transformation // Plant Cell Rep. – 1997. – Vol. 16. – P. 513-519.
7. Кучук Н.В. Генетическая генная инженерия высших растений. – Киев: Наукова думка, 1997. – 152 с.
8. Панарина В.И. Эндо- и экзогенные факторы регуляции плодо- и семяобразования у современных сортов гороха: автореф. канд. дис. с.-х. наук. – Орел, 2011. – 23 с.
9. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.

10. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны – М.: Наука, 1974. – 253 с.

11. Турецкая Р.Х. Эндогенные факторы корнеобразования растений // Биология развития растений. – М.: Наука, 1975. – С. 126-145.

References

1. Amelina K.V. Sozdanie i otsenka novogo selektsionnogo materiala prodovol'stvennogo gorokha v Ramoni // Sbornik nauchnykh trudov, posvyashchennyi 90-letiyu GNU VNISS Rossel'khozakademii: «Innovatsii v sveklosakharnom proizvodstve». – Voronezh, 2012. – S. 157-165.
2. Atanasov A. Biotekhnologiya v rastenievodstve / pod red. L.D. Kolosovoi, E.V. Daineko. – Novosibirsk: ITsiG SO RAN, 1993. – 241 s.
3. Suvorova G.N., Bobkov S.V., Soboleva G.V. Tekhnologii klonirovaniya zernobobovykh i krupyanykh kul'tur // Metodicheskie rekomendatsii. – M.: Rossel'khozakademiya, 2005. – 20 s.
4. Soboleva G.V. Bioinzhenernye tekhnologii polucheniya regenerantnykh rastenii gorokha in vitro // Regulyatsiya produktsionnogo protsessa sel'skokhozyaistvennykh rastenii. – Orel, 2006. – Ch. 2. – S. 185-194.
5. Nifontova S.N., Simonenko Yu.V., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V. Poluchenie transgennykh rastenii gorokha posevnogo (*Pisum sativum* L.), ustoichivyykh k gerbitsidu Pursuit // Tsitologiya i genetika. – 2005. – T. 39. – № 2. – S. 16-21.
6. Bean S.J., Gooding P.S., Mullineaux P.M., Davies D.R. A simple system for pea transformation // Plant Cell Rep. – 1997. – Vol. 16. – P. 513-519.
7. Kuchuk N.V. Geneticheskaya gennaya inzheneriya vysshikh rastenii. – Kiev: Naukova dumka, 1997. – 152 s.
8. Panarina V.I. Endo- i ekzogennye faktory regulyatsii plodo- i semyaobrazovaniya u sovremennykh sortov gorokha // Avtoref. ... kand. dis. s.-kh. nauk. – Orel, 2011. – 23 s.
9. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannykh tkanei i fiziologiya morfogeneza rastenii. – M.: Nauka, 1964. – 270 s.
10. Kefeli V.I. Prirodnye inhibitory rosta i fitogormony. – M.: Nauka, 1974. – 253 s.
11. Turetskaya R.Kh. Endogennye faktory korneobrazovaniya rastenii // Biologiya razvitiya rastenii. – M.: Nauka, 1975. – S. 126-145.

