

**ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК У РАСТЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ
В КАЧЕСТВЕ КОРМОВЫХ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ,
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТРЕССОУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ****И.И. ЛИТВИНОВА¹, Е.А. ГЛАДКОВ^{1, 2}**

Райграс пастбищный (*Lolium perenne* L.), лен крупноцветковый (*Linum grandiflorum* L.) сорта Голубой, брахикому иберисолистную (*Brachycome iberidifolia* L.) сорта Голубая неженка, хризантему килеватую (*Chrysanthemum carinatum* L.) сорта Радость и клевер ползучий (*Trifolium repens* L.) сорта Белый вводили в культуру клеток, используя семена растений. Показано, что оптимальной средой для каллусообразования для льна крупноцветкового были питательные среды Гамборга (В₅) с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д, 6 мг/л) и Мурасиге и Скуга (МС) с 2,4-Д (6 мг/л) и кинетином (2 мг/л); для райграса пастбищного — МС с 2,4-Д (4 мг/л); для брахикомы иберисолистной — В₅ с 2,4-Д (4 мг/л) и кинетином (2 мг/л) и В₅ с 2,4-Д (6 мг/л) и кинетином (2 мг/л); для хризантемы килеватой — МС с 6-бензиламинопурином (6-БАП, 1 мг/л) и индоллил-3-уксусной кислотой (0,1 мг/л); для клевера белого — В₅ с 2,4-Д (8 мг/л) и кинетином (2 мг/л). Для получения растений-регенерантов у райграса использовали среду МС без гормонов, у льна В₅ с 6-БАП (1 мг/л) и α -нафтилуксусной кислотой (НУК, 0,1 мг/л), у брахикомы — $1/2$ МС с 6-БАП (2 мг/л) и НУК (0,1 мг/л).

Ключевые слова: райграс пастбищный, лен крупноцветковый, брахикома иберисолистная, клевер белый, хризантема килеватая, каллус, семена, регенерация.

Keywords: *Lolium perenne*, *Linum grandiflorum*, *Brachycome iberidifolia*, *Chrysanthemum carinatum*, *Trifolium repens*, seeds, regeneration.

Большинство представителей декоративных растений, входящих в состав мавританского газона (лужайка низкорослых злаковых и цветущих луговых трав — райграса, клевера, василька, мака, льна декоративного, колокольчика, брахикомы, хризантемы, ромашки, астры и т.д.) (1), — хорошие медоносы, некоторые имеют важное кормовое и лекарственное значение. Так, райграс относится к наиболее ценным по кормовым достоинствам злакам (1, 2). Он характеризуется коротким вегетационным периодом (65-70 сут), пастбищеустойчивостью и высокой отавностью (три укоса за вегетацию), его включают в травосмеси при создании культурных пастбищ и сенокосов в северо-западных, западных и центральных районах лесной зоны. Райграс пастбищный (многолетний) возделывают на зеленый корм и сено (содержание протеина в зеленой массе — 3,2 %, клетчатки — 8 %) (3), он очень устойчив к изнашиванию благодаря быстрому отрастанию побегов и листьев. Представители семейства льновых — не только источники растительного масла, волокна, но и кормовые культуры, медоносы. Растения некоторых сортов хризантемы килеватой, у которой в листьях и цветках содержится β -каротин, используют в качестве лекарственных (как витаминное средство и для повышения иммунитета). Клевер белый (ползучий) — высокоценное кормовое и медоносное растение, при выращивании с райграсом, тимофеевкой и другими злаками он повышает кормовое достоинство луговых травосмесей (увеличивается содержание сырого протеина, жира, фосфора, калия, кальция и снижается содержание клетчатки), а также их урожайность благодаря обеспечению злаковых компонентов азотом (4). Клевер белый используется также в качестве лекарственного растения (5).

В то же время для таких растений часто характерна повышенная чувствительность к неблагоприятным экологическим факторам. Для получения стрессоустойчивых форм можно использовать биотехнологические

подходы. Например, получены растения кормовой культуры полевицы побегоносной, устойчивые к тяжелым металлам (6, 7), пшеницы, устойчивой к корневому затоплению (8) и кукурузы — к засухе (9).

Для клеточной селекции необходимо ввести растения в культуру клеток. Образование каллусов и регенерация зависит от множества факторов, в первую очередь от вида растения, состава питательной среды и условий культивирования. Даже у близкородственных таксонов, например клевера и люцерны, реакция на световые, температурные и гормональные агенты в культуре клеток различается (10). Ряд сложноцветных уже введены в культуру клеток: оптимизирован независимый от генотипа способ регенерации побегов из семян подсолнечника *in vitro* (11), подобраны условия для культивирования каллусных линий *Stevia rebaudiana* Bertoni (12).

Целью нашего исследования было введение в культуру клеток райграса пастбищного, льна крупноцветкового, брахикома иберисолистной, хризантемы килеватой и клевера ползучего.

Методика. В работе использовали семена райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), льна крупноцветкового сорта Голубой (*Linum grandiflorum* L.), брахикома иберисолистной сорта Голубая неженка (*Brachycome iberidifolia* L.), клевера ползучего сорта Белый (*Trifolium repens* L.), хризантемы килеватой сорта Радость (*Chrysanthemum carinatum* L.). Для получения каллусов и регенерации растений применяли агаризованные питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) (13) и Гамборга (B₅) (14) с разным содержанием сахарозы и регуляторов роста. В среду в различных концентрациях и комбинациях вносили ауксины — 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), α -нафтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК); цитокинины — 6-бензиламинопурин (6-БАП), кинетин. Для регенерации хризантемы и брахикома использовали половинную концентрацию компонентов среды МС с разным соотношением фитогормонов. Семена, которые использовали в качестве эксплантов, стерилизовали 1-кратной обработкой спиртом с последующей стерилизацией раствором, содержащим гипохлорит натрия, в течение 15-30 мин (в зависимости от вида растения), затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Оптимальное время стерилизации определяли на основании учета жизнеспособности и доли зараженных первичных эксплантов.

Частоту каллусообразования учитывали как процентное отношение числа образовавшихся каллусов к общему числу эксплантов, помещенных на питательную среду, частоту побегообразования — как отношение числа каллусов с побегами к общему числу каллусов на среде для морфогенеза.

Доверительный интервал рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента (надежность — 95 %).

Результаты. Для введения в культуру клеток райграса пастбищного семена высаживали на среду МС с разными концентрациями 2,4-Д (от 2 до 10 мг/л; из-за сильной зараженности время стерилизации раствором, содержащим гипохлорит натрия, 20 мин). Наибольшее каллусообразование наблюдали на средах с 2,4-Д в концентрации 4 мг/л (58,1 %) и 6 мг/л (54,3 %) (табл. 1). В этих условиях в течение 18-21 сут формировался каллус белого или светло-желтого цвета. Морфогенные каллусы получали культивированием на среде МС без гормонов; использование сред, содержащих фитогормоны, не приводило к повышению частоты образования таких каллусов. Значит, оптимальной для каллусообразования была среда МС с 4 мг/л 2,4-Д, для регенерации — среда МС без гормонов и для укоренения — половинная концентрация компонентов среды МС без гормонов.

Для введения в культуру клеток льна крупноцветкового семена вы-

1. Частота каллусообразования (%) у райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.) и льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* L.) сорта Голубой в зависимости от концентраций 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в питательной среде ($X \pm x$)

2,4-Д, мг/л	Среда МС	Среда В ₅
Райграс пастбищный		
1	10,2±1,5	
2	24,7±2,1	
4	58,1±3,9	
6	54,3±4,7	
8	44,6±5,0	
10	35,9±4,2	
Лен крупноцветковый		
1	10,2±0,5	30,5±2,7
2	35,0±2,3	29,4±3,6
4	40,2±4,0	56,4±7,8
6	57,1±6,0	60,0±6,1
8	75,4±8,4	53,8±5,6
10	44,0±3,3	40,2±4,2

Примечание. МС и В₅ — соответственно среда Мурасиге-Скуга и Гамборга (пропуски означают, что среду не использовали).

литературе отсутствуют, поэтому были использованы данные по другим видам льна. В наших экспериментах, как и в работах других исследователей со льном-долгунцом, отмечена зависимость каллусообразования от количественного состава фитогормонов в питательной среде, в частности обнаружено усиление каллусообразования с увеличением концентрации ауксина (15).

Для регенерации растений каллус пересаживали на среды с НУК и 6-БАП (НУК — 0,1-1 мг/л; БАП — 1-2 мг/л). Наибольшую частоту образования морфогенного каллуса у льна крупноцветкового отмечали на среде В₅ при концентрациях БАП — 1 мг/л и НУК — 0,1 мг/л (табл. 2). Часть каллусных клеток у льна при культивировании становились зелеными, регенерирующие каллусы формировались во 2-3-м пассаже. При получении растений-регенерантов льна-долгунца и льна масличного использовались указанные гормоны (16, 17), причем в случае со льном-долгунцом чем старше были семядольные экспланты, тем более высокие концентрации НУК требовались для побегообразования (15). При регенерации побегов на сегментах гипокоты большинства генотипов льна масличного оптимальная концентрация для 6-БАП была в пределах 1-2 мг/л, для НУК — 0,02-0,1 мг/л (18, 19).

2. Доля каллусов с побегами (%) у льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* L.) сорта Голубой в зависимости от концентраций 6-бензиламинопурина (6-БАП) и α-нафтилуксусной кислоты (НУК) в питательной среде ($X \pm x$)

Вариант 6-БАП + НУК, мг/л	Среда МС	Среда В ₅
1 + 0	20,1±1,9	32,2±3,5
1 + 0,1	40,5±2,8	60,1±4,1
1 + 0,5	37,4±4,6	52,3±3,8
2 + 0,1	35,5±3,4	47,0±3,3
2 + 0,5	25,3±2,7	28,8±2,6
1 + 1,0	10,2±0,6	15,2±1,8

Примечание. МС и В₅ — соответственно среда Мурасиге-Скуга и Гамборга.

После этого растения-регенеранты пересаживали на среду МС без гормонов для культивирования и дальнейшей пересадки для укоренения (рис., А). Следует отметить, что хотя максимальное количество каллусов образовывалось на средах В₅ с 2,4-Д (6 мг/л) и МС с 2,4-Д (8 мг/л), реге-

саживали на среды МС и В₅ с разными концентрациями 2,4-Д, в ряде случаев добавляли кинетин (2 мг/л). Оптимальными (табл. 1) оказались среды В₅ 2,4-Д с (6 мг/л) (60,0 %) и МС с 2,4-Д (8 мг/л) (75,4 %). В этих условиях каллус был светло-желтого, светло-зеленого цвета, средней плотности, формировался в течение 14-20 сут. Также высокую частоту каллусообразования наблюдали на средах В₅ с 2,4-Д (4 мг/л) (56,4 %) и МС с 2,4-Д (6 мг/л) (57,1 %) (см. табл. 1). Работы по введению в культуру клеток льна крупноцветкового в доступной научной

нерационная способность в большей степени сохранялась у каллусов, полученных на среде МС с 2,4-Д (6 мг/л) и кинетином (2 мг/л).



Регенеранты льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* L.) сорта Голубой (А) и брахикомы иберисолистной (*Brachycome iberidifolia* L.) сорта Голубая неженка (Б) в условиях *in vitro*.

Так как работы по введению в культуру клеток брахикомы иберисолистной отсутствуют, мы использовали питательные среды МС и Гамборга, применяемые для некоторых сложноцветных. Оптимальными для формирования каллусов из семян брахикомы иберисолистной были среды с сочетанием ауксина и цитокинина (табл. 3): среда В₅ с 2,4-Д (6 мг/л) и кинетином (2 мг/л) (50,1 %), а также среда МС с 2,4-Д (6 мг/л) и кинетином (2 мг/л) (55,4 %), формировались каллусы светло-желтого цвета, средней плотности. При концентрациях 2,4-Д 1; 2 и 4 мг/л наблюдалось интенсивное прорастание семян.

3. Частота каллусообразования у брахикомы иберисолистной (*Brachycome iberidifolia* L.) сорта Голубая неженка и клевера ползучего (*Trifolium repens* L.) сорта Белый в зависимости от концентрации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и кинетина в среде В₅ ($X \pm x$)

Вариант 2,4-Д + кинетин, мг/л	Брахикома иберисолистная	Клевер ползучий
1	20,3±1,8	0
2	25,4±2,4	12,4±0,9
4	30,1±2,7	18,4±1,2
6	45,0±4,8	36,0±2,4
8	40,2±3,6	40,1±2,7
10	30,1±5,2	43,5±3,1
1 + 2	10,7±1,2	15,6±1,4
2 + 2	32,4±2,6	22,1±3,8
4 + 2	44,6±2,9	35,2±4,1
6 + 2	50,1±4,2	43,3±3,9
8 + 2	45,2±3,1	60,2±6,5
10 + 2	21,2±2,3	45,5±3,6

Примечание. В₅ — среда Гамборга.

Регенеранты брахикомы иберисолистной были получены на среде 1/2МС с НУК (0,1 мг/л) и 6-БАП (2 мг/л) (62,3 %) (см. рис., Б), при уменьшении концентрации 6-БАП до 1 мг/л частота образования регенерантов значительно снизилась (до 20 %). Также следует отметить, что высокой регенерационной способностью обладали каллусы, которые получили на среде В₅ с 2,4-Д (4 мг/л) и кинетином (2 мг/л) (44,6 %).

Согласно данным литературы, для введения клевера белого в культуру клеток используют модифицированную питательную среду Гамборга (10), на которой около 2/3 генотипов исходной популяции клевера образуют каллус. В наших опытах для получения каллуса клевера белого применяли среду В₅ с разными концентрациями 2,4-Д, а также в сочетании 2,4-Д с кинетином (см. табл. 3). Добавление в среду кинетина позволило

повысить частоту образования каллусных клеток (см. табл. 3). Оптимальной для каллусообразования (60,2 %) оказалась среда В₅ с 2,4-Д (8 мг/л) и кинетином (2 мг/л).

Для получения каллусных тканей хризантемы килеватой семена высаживали на среды МС, содержащие 6-БАП, кинетин, ИУК и НУК в различных комбинациях и концентрациях. Интенсивное каллусообразование наблюдали при добавлении в питательную среду 6-БАП и ИУК, наибольшее (78,2 %) — на среде МС с 6-БАП в концентрации 1 мг/л и ИУК (0,1 мг/л). Это совпадает с данными ряда работ, в которых сообщалось об усилении роста и образовании плотной ткани каллуса на средах, содержащих ИУК (20, 21). В то же время отмечалось, что при культивировании лепестков хризантемы в присутствии ИУК и 6-БАП имеет место образование рыхлой каллусной ткани, в которой не происходит дифференциация меристематических очагов, дающих начало развитию побегов (16). В нашем опыте на среде с двумя фитогормонами образовывался плотный каллус, способный к морфогенезу. Далее полученные каллусы пересаживали на среду 1/2МС с 6-БАП (0,5 мг/л) и через 2-3 пассажа получили морфогенные каллусы (24,8 %).

Оптимизированные питательные среды были использованы для получения каллусных культур и растений, устойчивых к меди. В зависимости от вида и сорта растения ингибирующее воздействие регистрировали уже при концентрации меди в питательной среде 10-30 мг/л, в качестве селективных были выбраны концентрации меди 20, 30 и 40 мг/л.

Таким образом, подобраны среды для каллусообразования из семян и регенерации у райграса пастбищного, льна крупноцветкового, брахикомы иберисолистной, хризантемы килеватой и клевера белого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесникова Е.Г. Газоны элементы садового дизайна. М., 2010.
2. Зотов А.А., Кобзин А.Г., Сабитов Г.А. Райграсс пастбищный в луговом кормопроизводстве. Тверь, 2007.
3. Сафина Н.В. Райграсс пастбищный в условиях Поволжья. Мат. Всерос. школы молодых ученых и специалистов «Перспективные технологии для современного сельскохозяйственного производства». Ульяновск, 2010: 115.
4. Кобзин А.Г., Тюлин В.А., Тихомирова Т.М., Вагунин Д.А. Урожайность пастбищных травосмесей с райграссом пастбищным. Кормопроизводство, 2011, 11: 12-13.
5. Попов П.Л. Виды растений, применявшиеся при вирусных болезнях человека и животных: закономерности распределения в филогенетической классификационной системе. Журнал стресс-физиологии и биохимии, 2008, 4(3-4): 17-64.
6. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной с комплексной устойчивостью к тяжелым металлам и засолению методами клеточной селекции. С.-х. биол., 2009, 6: 85-88.
7. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Оценка комплексной фитотоксичности тяжелых металлов и получение растений, обладающих комплексной устойчивостью. Биотехнология, 2007, 1: 81-86.
8. Аль-Холани Х.А.М., Долгих Ю.И. Определение концентрации маннита для использования в процессе клеточной селекции на устойчивость к засухе у кукурузы. Вестник РУДН, сер. Агрономия и животноводство, 2007, 1-2: 38-42.
9. Степанова А.Ю., Долгих Ю.И., Вартапетян Б.Б. Получение растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.), устойчивых к корневому загниванию. Биотехнология, 2010, 3: 64-69.
10. Мезенцев А.В., Любавина Л.А. Методические указания по регенерации и размножению клевера лугового в культуре *in vitro*. М., 1983: 4.
11. Нескородов Я.Б., Мишутника Я.В., Гапоненко А.К., Скрябин К.Г. Метод регенерации *in vitro* побегов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) из асептических семян как эксплантов для генетической трансформации. Биотехнология, 2007, 6: 27-33.
12. Лукаткин А.С., Хомутова И.Н. Оптимизация условий культивирования каллусных линий *Stevia rebaudiana* Bertoni и перспективы их использования. В сб: Актуаль-

- ные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов. М., 2001: 251-255.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-476.
 14. Gambourg O.L., Elevagh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.*, 1968, 46: 417-421.
 15. Белоногова М.А., Ралдугина Г.Н. Регенерация побегов на семядольных эксплантах льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) и их укоренение. *Физиология растений*, 2006, 53(4): 560-564.
 16. Jordis H.S., Drexler J.A., Scheffler H.E. Evaluation of putative seed-specific promoters for *Linum usitatissimum*. *Mol. Breed.*, 2003, 11: 149-158.
 17. Basiran N., Armitage P., Scott R.J., Drapper J. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: regeneration of transformed shoots via callus phase. *Plant Cell Reports*, 1987, 6: 396-399.
 18. Поляков А.В. Биотехнология в селекции льна. Тверь, 2000: 139-144.
 19. Чикризова О.Ф., Поляков А.В. Эффективность использования питательных сред для массового получения трансгенных растений льна. *Мат. Межд. науч.-практ. конф., посвященной 70-летию ВНИИ льна «Итоги и перспективы развития селекции, семеноводства, совершенствования технологии возделывания и первичной переработки льна-долгунца»*. Торжок, 2000: 42-44.
 20. Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Разработка методов регенерации и трансформации хризантем (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). В сб.: *Новые методы биотехнологии растений*. Пушкино, 1993: 34.
 21. Гранда Р. Микрклональное размножение хризантем. *Известия ТСХА*, 2009, 1: 146-148.

¹ФГБОУ ВПО Московский государственный университет инженерной экологии,
105066 г. Москва, ул. Старая Басманная, 21/4;
e-mail: ilina-15@ya.ru;

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 г. Москва, ул. Ботаническая, 35,
e-mail: gladkov@mail.ru

Поступила в редакцию
5 апреля 2011 года

INTRODUCTION TO CELL CULTURE USED FOR OBTAINING FODDER AND DECORATIVE PLANTS RESISTANT TO STRESS

I.I. Litvinova¹, E.A. Gladkov^{1, 2}

S u m m a r y

With the aim of developing a culture method for efficient plant regeneration in vitro, the aseptically treated seeds of *Lolium perenne* L., *Linum grandiflorum* L., *Brachycome iberidifolia* L., *Chrysanthemum carinatum* L. and *Trifolium repens* L. were cultured on B₅ and Murashige and Skoog (MS) media, containing different combinations of plant growth regulators to induce a callus. The highest percentage of calluses of *Linum grandiflorum* was observed on B₅ with 2,4-D (6 mg/l) and MS with 2,4-D (6 mg/l) and kinetin (2 mg/l). In *Lolium perenne* L., MS with 2,4-D (4 mg/l) was used for the best callus formation. In *Brachycome iberidifolia*, B₅ with 2,4-D (4 mg/l) and kinetin (2 mg/l) or B₅ with 2,4-D (6 mg/l) and kinetin (2 mg/l) were the most effective combinations. The best callus formation for *Chrysanthemum carinatum* and *Trifolium repens* were achieved on MS supplemented with 6-BAP (1 mg/l) and IAA (0,1 mg/l) and B₅ enriched with 2,4-D (8 mg/l) and kinetin (2 mg/l), respectively. MS free of phytohormones, B₅ with 6-BAP (1 mg/l) and NAA (0,1 mg/l), and 1/2MS with 6-BAP (2 mg/l) and NAA (0,1 mg/l) were identified as the optimal combination for plant regeneration for *Lolium perenne* L., *Linum grandiflorum* and *Brachycome iberidifolia*, respectively.

Внимание читателей! Вышла в свет книга: Гладков Е.А. Биоэкология. Учебное пособие. М.: изд-во МГУИЭ, 2011, 136 с.

Рассматриваются фундаментальные проблемы экологии как биологической науки, изложены основные сведения современной экологии: экологические факторы и адаптация к ним организмов, экология популяций и сообществ, экосистемы и биосфера. Учебное пособие предназначено студентам, изучающим теоретические курсы дисциплин «Общая экология», «Экология», «Биоэкология» и обучающимся специальностям «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов», «Инженерная защита окружающей среды», «Биотехнология», бакалаврам по направлениям «Техносферная безопасность», «Биотехнология», «Экология и природопользование», «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии».