

Корма и кормопроизводство: биологические основы

УДК 636.086.2/.3:581.143.6:[573.6.086.83+577.21]

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ЛЮЦЕРНЫ КЛЕЙКОЙ (*Medicago glutinosa* L.), УСТОЙЧИВЫХ К НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯМ, БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОГО АГЕНТА

Е.В. ОРЛОВА¹, А.Ю. СТЕПАНОВА²

У растений-регенерантов люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.), выделенных по оптимизированной схеме (с выявлением сомаклональной изменчивости), определили устойчивость к нефтеагрязнениям. Состояние растений оценивали по выживаемости и приросту за 56 сут. Среди регенерантов 20 % растений оказались хуже контроля, у 65 % — показатели не отличались от таковых у исходной формы, у 15 % — были выше, чем в контроле и у остальных растений-регенерантов. Растения-регенеранты в большей степени способствовали очищению почвы от нефтеагрязнений по сравнению с контролем (растениями, выращенными из семян).

Ключевые слова: *Medicago glutinosa* L., сомаклоны, нефть.

Keywords: *Medicago glutinosa* L., somaclones (regenerants), petroleum.

Люцерна клейкая — перспективное кормовое растение, используется для создания и улучшения сенокосов и пастбищ на южных территориях с недостаточным увлажнением. Характеризуется высокой семенной продуктивностью в неблагоприятные годы, долголетием, достаточно зимо-, жаро- и засухоустойчива (1). Выращивание люцерны ускоряет процесс накопления органического вещества в почве, улучшает ее физико-химические свойства и, кроме того, способствует развитию нефтеокисляющих бактерий (2).

Значительная часть почвенного покрова в настоящее время в той или иной степени загрязнена нефтепродуктами в результате увеличения числа АЗС, автотранспортных потоков. Особенно сильно это выражено в регионах, через которые проходят нефтепроводы, где расположены предприятия химической промышленности, использующие нефть в качестве сырья. При попадании нефти частицы почвы агрегируются, нарушается ее пористость и плотность, что приводит к ухудшению аэрации, температурного и водного режимов, изменению структуры и видового состава микробиоценоза, снижению содержания азота и фосфора (3, 4). При этом угнетается рост растений, снижается содержание хлорофиллов и каротиноидов, уменьшается всхожесть семян, замедляется ежесуточный прирост корней, происходит задержка или полное выпадение фенофаз в развитии растений, затягивается начало вегетации (5, 6). Большинство растений чувствительны к нефтеагрязнениям: содержание 0,3 % нефти подавляет рост и развитие, при 5 % нефти большинство растений погибают (7). В результате на площадях, загрязненных нефтепродуктами, частично или полностью уничтожается растительный покров, что повышает актуальность получения устойчивых к нефтеагрязнениям форм.

С этой целью в современной селекции широко применяются биотехнологические подходы, основанные на культивировании растительных клеток *in vitro*. Однако использование нефти в качестве селективного агента затруднено, так как она гидрофобна и неравномерно распределяется в агризованной среде, образуя мицеллы. В то же время известно, что при культивировании возможно возникновение сомаклональных вариантов, в том числе устойчивых к различным стрессам, но среди многочисленных пуб-

ликаций по этой проблеме (8-10) мы не обнаружили работ, посвященных оценке устойчивости сомаклонов к нефтезагрязнениям.

Нами были поставлены следующие задачи: оптимизировать условия стерилизации семян люцерны, подобрать среды для регенерации растений, получить растения-регенеранты, оценить их рост, устойчивость, а также фиторемедиационный потенциал в условиях нефтезагрязнений.

Методика. В качестве объекта исследований использовали растения люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.). Семена стерилизовали коммерческим отбеливателем «Белизна» в течение 20, 30 и 40 мин, после чего трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на твердую питательную среду Гамборга (B_5) (11) с половинной нормой макро- и микроэлементов. Каллус получали из семядолей стерильных 1-недельных проростков. Для индукции и роста каллуса использовали полную среду Гамборга (B_5) с добавлением никотиновой кислоты (1 мг/л), тиамина (10 мг/л), пиридоксина (1 мг/л), мезо-инозита (100 мг/л), 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д, 2 мг/л), кинетина (0,2 мг/л) и сахарозы (30 г/л). Каллус инкубировали в чашках Петри при 26 °С и естественном освещении (длина светового дня 16 ч), при субкультивировании перенос на свежую питательную среду осуществляли через 28-30 сут. Полученный каллус культивировали в течение 10 мес. Для стимуляции регенерации каллус помещали на среду B_5 с 6-бензиламинопурином (6-БАП, 0,5 мг/л) вместо кинетина и 2,4-Д. Для повышения эффективности эмбриогенеза среду модифицировали, добавляя пролин (500 мг/л) или аргинин (600 мг/л). Для стимуляции ризогенеза растения пересаживали в стерильные сосуды объемом 100 мл на среду B_5 (полную или с половинным содержанием макро- и микроэлементов), в которую вносили α -нафтильуксусную кислоту (НУК, 5 мг/л) или индолил-3-масляную кислоту (ИМК, 0,5 мг/л). Растения со сформированными корнями перед высадкой в сосуды с землей инкубировали в течение 10-14 сут в закрытых баночках на влажной вате.

В экспериментах использовали нефть, полученную с Московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ), со следующими характеристиками: удельный вес — 0,83; суммарное содержание углеводородов — 81,2 %, в том числе n-алканов — 9,3; изоалканов — 7,9; нафтенов — 11,7; ароматических углеводородов — 64,0 %; содержание смол — 3,1 %, асфальтенов — 4,0 %. Для изучения реакции растений-регенерантов люцерны на нефтезагрязнения их высаживали в специальные емкости, куда вносили почву (100 г) с предварительно добавленной нефтью (из расчета конечного содержания 5 %, почву тщательно перемешивали), и выращивали в течение 60 сут. Контролем служили растения, выращенные из семян. В опытах использовали 20 контрольных растений и 20 растений-регенерантов. Были испытаны следующие варианты: почва без нефти (для оценки загрязнения почвы углеводородами), почва + нефть (для оценки способности к утилизации нефти аборигенной микрофлорой), почва + нефть + растения, выращенные из семян (контроль), почва + нефть + растения-регенеранты. Содержание нефти определяли гравиметрическим методом с экстракцией хлороформом. Для анализа отбирали пробы почвы из разных участков используемых контейнеров и оставляли в открытом виде для высушивания до воздушно-сухого состояния. Образец почвы (2 г) помещали в стеклянную колбу, добавляли 20 мл хлороформа и тщательно перемешивали. Экстракт через бумажный фильтр переносили в предварительно взвешенную с точностью до ± 1 мг круглодонную колбу со шлифом объемом 100 мл. Экстракцию почвы хлороформом повторяли 3 раза, экстракты объединяли в

общую пробу. Затем хлороформ выпаривали на роторном испарителе при температуре водяной бани 58 °С. Количество нефти определяли весовым способом на аналитических весах марки ВПР-200 (Россия) с точностью до 4-го знака.

Содержание нефтепродуктов рассчитывали как $X_k = (A/B) \times 1000$, где A — количество нефтепродуктов, полученное при взвешивании, мг; B — масса навески почвы, взятой для анализа, г. Процент утилизации нефти определяли по формуле:

$$X = \left(\frac{X_k}{X_h} \right) \cdot 100\%,$$

где X_k и X_h — количество нефтепродуктов соответственно в конце и начале опыта.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. В тексте и таблицах приведены средние арифметические величины параметров и их доверительные интервалы при 95 % уровне вероятности по *t*-критерию Стьюдента. Бары на диаграммах соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов.

Результаты. В настоящей работе впервые выполнена оценка устойчивости сомаклонов растений к нефтезагрязнениям. Схема получения сомаклональных вариантов из каллусных культур с использованием сред разного состава представлена на рисунке 1.

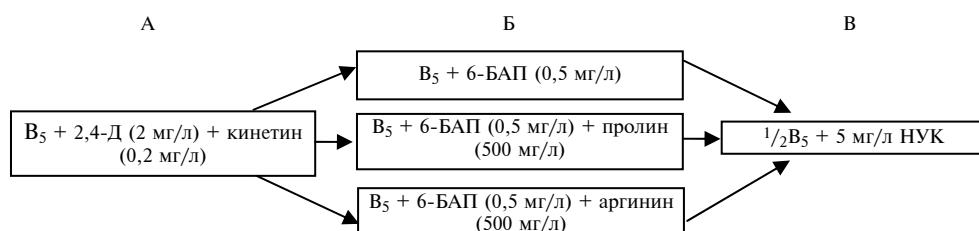


Рис. 1. Схема последовательной смены вариантов среды (на основе среды Гамборга B_5) при получении растений-регенерантов из семян люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.): А — среда для каллусогенеза, Б — среда для регенерации, В — среда для укоренения; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксикусная кислота, 6-БАП — 6-бензиламинопурин, НУК — α -нафтилуксусная кислота.

При проведении экспериментов с культурами тканей *in vitro* важно располагать асептическим материалом с высокой жизнеспособностью, для чего чаще всего применяют хлорсодержащие агенты — гипохлорит кальция или натрия. В использованном нами коммерческом отбеливателе «Белизна» содержание гипохлорита натрия составляет 4–7 %. Как оказалось, оптимальное время стерилизации семян люцерны — 20 мин (табл. 1). Более продолжительная обработка приводила к снижению их жизнеспособности без заметного влияния на эффективность стерилизации.

1. Выход жизнеспособного асептического материала при стерилизации семян люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.) хлорсодержащим раствором «Белизна»

Время стерилизации, мин	Общее число семян, шт.	Число семян, шт. (доля, %)		
		асептически жизнеспособных	асептически нежизнеспособных	инфицированных
20	40	35 (87,5)	3 (7,5)	2 (5,0)
30	42	30 (71,4)	10 (23,8)	2 (4,8)
40	40	31 (77,5)	8 (20,0)	1 (2,5)
50	45	35 (77,8)	9 (20,0)	1 (2,2)

Для получения каллуса люцерны из семядолей 10-суточных проро-

стков обычно применяют питательную среду, содержащую макросоли, микросоли и витамины по Гамборгу (среда В₅), а также среды Шенка-Хильдебрандта и Мурасиге-Скуга (12, 13). Для индукции каллусогенеза в среду добавляют 2,4-Д и кинетин (14), причем их соотношение подбирается индивидуально в зависимости от генотипа, в некоторых случаях в среду вносят НУК или ИУК. На основании предварительных экспериментов в качестве основной среды для получения каллусов была выбрана среда В₅ с 2,4-Д (2 мг/л) и кинетином (0,2 мг/л).

Для регенерации каллусы пересаживали на среду В₅, содержащую 6-БАП (0,5 мг/л), с добавлением аминокислот или без их внесения. Известно, что аминокислоты (L-пролин, L-аланин, L-глутамин, L-аспарагин, L-серин и L-лизин, L-аргинин) повышают эффективность эмбриогенеза, а также способствуют увеличению числа сомаклонов (15, 16). В наших экспериментах после пересадки на среду для регенерации отмечалось увеличение числа каллусов с зелеными очагами (морфогенных каллусов) на всех типах сред (табл. 2). Тем не менее, побеги (с последующим образованием полноценных растений-регенерантов) у морфогенных каллусов в большинстве случаев формировались только на среде с аминокислотами (рис. 2).

2. Показатели эффективности морфогенеза в каллусной культуре у люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.) в зависимости от состава индуцирующей среды

Вариант среды	Общее число каллусов, шт.	Морфогенные каллусы	
		число, шт.	% ($X \pm x$)
Среда В ₅ + 6-БАП (0,5 мг/л)	193	161	83±2,7
Среда В ₅ + 6-БАП (0,5 мг/л) + аргинин (600 мг/л)	117	99	84±3,4
Среда В ₅ + 6-БАП (0,5 мг/л) + пролин (500 мг/л)	88	60	68±4,9

При мечание. 6-БАП — 6-бензиламинопурин: подробное описание состава сред см. в разделе «Методика».

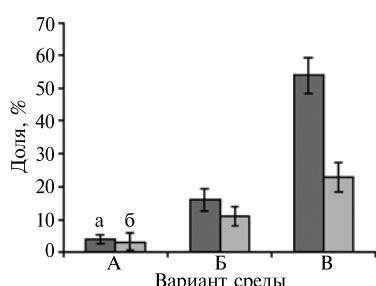


Рис. 2. Эффективность регенерации растений у люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.) из каллусной культуры в зависимости от состава индуцирующей среды: А — В₅ + 6-БАП (0,5 мг/л), Б — В₅ + 6-БАП (0,5 мг/л) + аргинин (600 мг/л), В — В₅ + 6-БАП (0,5 мг/л) + пролин (500 мг/л); а — каллусы с побегами, б — растения-регенеранты.

Таким образом, лучшей питательной средой, обеспечивающей более высокий процент каллусов с побегами (54 %) и растений-регенерантов (23 %), оказалась среда В₅ с добавлением пролина.

По данным литературы, содержание нефти в почве, выбранное нами для выращивания растений-регенерантов и контрольных образцов (5 %), считается очень высоким и приводит к гибели растений у большинства видов (16). Оценка выживаемости за 56 сут (рис. 3) показала, что у 20 % растений-регенерантов она была ниже, чем в контроле (после высадки в почву с нефтью растения остановились в росте, быстро пожелтели и погибли в течение первых 7 сут); у 65 % сохранилась жизнеспособность на уровне контроля. Отметим, что к завершению эксперимента доля жизнеспособных контрольных растений была больше (80 %).

Среди выживших растений-регенерантов выделялась группа, составляющая 15 %, которая визуально выглядела более жизнеспособной по сравнению с контролем (большинство листьев сохранили зеленый цвет) при большем приросте в высоту (220±7,2 % относительно исходной у растений каждой группы), чем у контрольных растений (110±5,1 %) и остальных растений-регенерантов (160±6,7 %). Иными словами, растения-

регенеранты разделились на три группы: с устойчивостью к нефтезагрязнениям ниже контрольной, на уровне ее и выше контроля.

Наибольшее снижение содержания нефти в почве наблюдалось при выращивании растений-регенерантов. Так, степень деградации этого поллютанта в почве без растений составила $15,07 \pm 3,5\%$, в варианте с высажкой контрольных растений люцерны и растений-регенерантов — соответственно $48,98 \pm 1,8\%$ и $56,90 \pm 1,4\%$. Скорее всего, последнее связано с деятельностью более жизнеспособных растений-регенерантов, доля которых составляла 15 % от всех полученных.

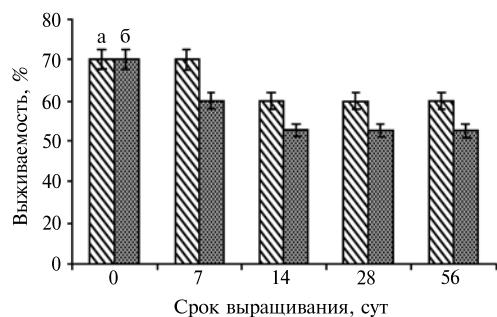


Рис. 3. Выживаемость контрольных (а) растений люцерны клейкой (*Medicago glutinosa* L.) и растений-регенерантов (б), полученных из каллусной ткани без использования селективного агента, после 56 сут выращивания в почве с содержанием нефти 5 %.

крайней *Medicago glutinosa* L. Впервые выполнена оценка устойчивости растений-регенерантов к нефтезагрязнениям и их способности к деструкции нефтепродуктов, подтвердившая, что устойчивые формы выделены без использования селективного агента (нефть) за счет выявляемой сомаклональной изменчивости. У 15 % растений, полученных с использованием культуры ткани, регистрируется более активный рост по сравнению с другими растениями-регенерантами и контролем. В дальнейших экспериментах было показано, что растения-регенеранты в большей степени способствовали очищению почвы от нефтезагрязнений, чем растения, выращенные из семян.

Известно, что основным механизмом фиторемедиации нефтезагрязненной почвы с участием растений люцерны служит ризодеградация. В этом случае очищение почвы происходит за счет микроорганизмов — деструкторов нефтепродуктов, размножение которых стимулируют корневые выделения растений (17, 18). Очевидно, что у растений с повышенной жизнеспособностью ризодеградация происходит более эффективно.

Итак, нами оптимизированы условия для каллусогенеза и регенерации растений у люцерны клейкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirk J.L., Kliironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. Environ. Pollut., 2005, 13: 455–465.
2. Буяникин Н.И. О причинах некоторых биологических особенностей однолетних культур при высеве летом и их практическом использовании. С.-х. биол., 2008, 5: 1-10.
3. Гузев В.С., Левин С.В., Селецкий Г.И. и др. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв. В сб: Микроорганизмы и охрана почв. М., 1989: 121-150.
4. Гашева М.Н., Гашев С.Н., Соромотин А.В. Состояние растительности как критерий нарушенности лесных биоценозов при нефтяном загрязнении. Экология, 1990, 2: 77-78.
5. Adam G., Duncanson H.J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. Environ. Geochem. Health, 2000, 21: 353-357.
6. Давыдова И.Ю., Пахненко-Дурынина Е.П. Реакция сельскохозяйственных растений на загрязнение почвы нефтью. В сб. науч. тр.: Вопросы региональной географии и геоэкологии /Отв. ред. В.А. Кривцов. Рязань, 2004, вып. 4: 119-129.
7. McGrath D. Oil spillage on grassland effects on grass and soil. Farm Food Res., 1988, 19(5): 28-29.

8. И скаков А.Р. Селекционная ценность растений ячменя, регенерированных из культуры соматических тканей. Мат. Респ. конф. «Проблемы теоретической и прикладной генетики в Казахстане». Алма-Ата, 1990: 111-115.
9. Бобков С.В., Сидоренко В.С., Гуринович С.О. Использование биотехнологических подходов в селекции проса (*Panicum miliaceum* L.). Мат. II Межд. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии». М., 2000: 85.
10. Heinz D.J., Krishnamurthi M., Nickeleil L.G., Maretzki A. Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag. 1977: 3-17.
11. Gamburg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, 50: 151-158.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-497.
13. Shenk R.V., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.*, 197, 50: 199-204.
14. Attanassov A., Brown D. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1984, 3(2): 149-162.
15. Stuart D.A., Strickland S.G. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of aminoacid addition to the regeneration medium. *Plant Sci. Let.*, 1984, 34: 165-174.
16. Duncan D.R., Williams M.T., Zehr B.T., Widholm J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*, 1985, 165: 322-332.
17. Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.*, 2002, 18: 647-658.
18. Fricke C.M., Farrel R.E., Germida J.J. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. Canada: Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC). Calgary, 1999: 10-50.

¹ФГБОУ ВПО Московский государственный университет инженерной экологии,
105066 г. Москва, ул. Старая Басманская, 21/4,
e-mail: ekatia@inbox.ru;

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

Поступила в редакцию
11 января 2012 года

THE OBTAINING REGENERANTS OF *Medicago glutinosa* L. RESISTANT TO OIL POLLUTION WITHOUT USE OF THE SELECTIVE AGENT

E.V. Orlova¹, A.Yu. Stepanova²

S um m a r y

Basing on a somaclonal variability, the regenerants of *Medicago glutinosa* L. resistant to petroleum pollution were selected in vitro by an optimized scheme without an addition of selective agent to the media for induction of callus and regenerants. Such parameters as a survival rate for 56 days and plant height of the regenerants and the intact plants were compared. In 20 % of the regenerated plants the resistance was lower and in 65 % it was the same as compared with the control, and 15 % of the regenerated plants demonstrated a greater increase comparing to the other plants. It was shown regenerants contributed to a better purification of soil, polluted with petroleum as compared to intact plant grown from seeds.

Новые книги

Мееровский А.С., Бирюкович А.Л. **Оптимизация травостоев сенокосов и пастбищ.** Минск: изд-во «Беларусская наука», 2009, 231 с.

В монографии изложены сведения о современном состоянии и тенденциях развития луговодства в стране. Проанализированы экспериментальные данные, полученные в течение 25-летних исследований травостоев на разных типах почв. Приведены принципы конструирования сенокосных и пастбищных травостоев и техника расчета норм посева.

Рассмотрена фитоценотическая совместимость многолетних трав в луговых агроценозах, предложены составы травосмесей для разных типов почв. Приведены материалы по рациональному использованию луговых травостоев, подсеву трав в старовозрастную дернину, влиянию удобрений на продуктивное долголетие травостоев. Рассмотрены принципы организации зеленого конвейера, проектирования пастбищ. Книга адресована специалистам АПК и научным работникам.