



УДК 635.65:575

ОСОБЕННОСТИ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ГОРОХА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Т.П. Жужжалова**М.Н. Сащенко**

ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова
Россельхозакадемии, 396030
Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 8(47340) 5-33-27

e-mail: vniiss@mail.ru,
samani84@mail.ru

В статье представлен усовершенствованный метод микрорепродуктивного размножения гороха, включающий этапы стерилизации эксплантов, их введение в условия *in vitro*, собственно размножение и укоренение регенерантов.

Ключевые слова: микрорепродуктивное размножение, горох, стерилизация, культура тканей, укоренение.

Введение

К настоящему времени установлено, что необходимость получения высокопродуктивных, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам сортов и гибридов гороха требует использования современных методов биотехнологии, ускоряющих селекционный процесс и повышающих его эффективность. В процессе селекции отбор и сохранение ценных исходных и полученных форм затрудняется [4]. Нередко гибель зародышей возникает на ранних стадиях развития. Поэтому трудности получения необходимых признаков затягивают всю селекционную работу.

С целью повышения результативности селекционных работ для размножения ценных селекционных номеров в настоящее время разрабатываются методы на основе культуры изолированных тканей. Биотехнологические методы дают возможность получать и сохранять генетически однородный материал и проводить направленные отборы.

Анализ литературных данных показал, что ранее разработанные методики микроразмножения гороха очень громоздки и трудоемки, что усложняет работу по созданию и сохранению генетического разнообразия ценной зернобобовой культуры – гороха [2, 5].

Для разработки метода микрорепродуктивного размножения гороха было проведено изучение влияния состава питательных сред и различных эксплантов на культивирование в условиях *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 эксплантов гороха.

Методы исследований

В качестве эксплантов для введения в культуру тканей использовали зрелые семена и фрагменты растений различных сортов гороха Рамонской селекции. Стерилизацию эксплантов проводили растворами веществ: доместос, мертиолят, ломакс-хлор. Вещества использовались в разных концентрациях с экспозицией 30 минут. Культивирование растений осуществлялось на питательной среде с минеральной основой по Мурасиге и Скугу, витаминами по Уайту с добавлением сахарозы, приготовленной по общепринятым методикам [1], в оптимальных условиях $t = +23-25^{\circ}\text{C}$, 16-ти часовой фотопериод.



Результаты исследований

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.

Среди изученных агентов хлорамин 10 % обладал наименьшим стерилизующим эффектом, инфицированность эксплантов составляла 90,9 %, из которых 39,4 % грибная и 51,5 % бактериальная инфекция (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных стерилизующих агентов на обеззараживание семенного материала в условиях *in vitro*

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Количество введенных семян, шт.	Наличие инфекции		Неинфицированные растения %	Развитие регенерантов в баллах
			грибной %	бактериальной %		
Хлорамин Б	10	99	39,4	51,5	9,1	2
Ломаксхлор	0,05	384	12,5	10,4	77,3	5
Мертиолят	0,01	132	2,3	2,3	95,5	3
Domestos	10	141	2,1	2,1	95,7	3
Анолит	10	207	8,7	10,1	81,2	4

Количество стерильных проростков не превышало 9,1 %. После обработки семян гороха хлорамином Б растения формировались недоразвитыми и уродливыми. Их длина составляла 1-3 см. Листочки на проростках были скручены и имели светло-зеленый цвет. Корешок растения имел длину 1-2 см. Оценка состояния проростка по 5 балльной шкале составляла 2 балла. Растения обладали низкой жизнеспособностью, через 10 дней культивирования проростки засыхали и не могли использоваться для дальнейшей работы.

Применение раствора ломаксхлора обеспечивало большой стерилизующий эффект материала – 77,3 %. Количество инфицированных растений в условиях *in vitro* составляло 12,5 % и 10,4 % грибной и бактериальной микрофлорой соответственно. Аномалий в развитии проростков после обработки семян раствором ломаксхлора не наблюдалось. При этом растения имели хорошо развитую корневую систему с многочисленными боковыми корешками. Длина главного корня составляла 7-8 см. Утолщенный стебель имел длину 5-6 см. Проросток имел насыщенную зеленую окраску. Оценка состояния проростков – 5 баллов. Высокий балл обусловлен наличием хорошо развитой корневой системы и утолщенным, длинным стеблем с многочисленными листочками.

Высокий стерилизующий эффект наблюдался так же после обработки семян гороха растворами мертиолята и domestos – 95,5 % и 95,7 % соответственно. При применении мертиолята общая зараженность растений составляла 4,6 %, domestos – 4,2%. Инфицированность материала грибной и бактериальной микрофлорой была на одинаковом уровне, то есть количество зараженных проростков после применения мертиолята и domestos составляло 2,3 % и 2,1 %, соответственно. Вместе с тем, применение растворов оказывало ингибирующее действие на жизнеспособность проростков. Так, после 5-7 дней культивирования растения выглядели слабыми. Длина корешка была около 1 см. Стебелек проростка имел желтоватую окраску и небольшие размеры (около 1,5 см). Несмотря на высокое стерилизующее действие данных растворов, оценка состояния проростков – 3 балла.

При стерилизации семян раствором анолита число обработанных эксплантов составляло 207 штук. Эффект стерильности равнялся 81,2 %. Корневая система растений была нормально развита и имела длину 3-4 см. Стебли проростков характеризовались сильной вытянутостью. Их длина составляла 5-6 см. Оценка состояния проростков – 4 балла.



Таким образом, оптимальным стерилизующим агентом для обеспечения стерильности и сохранения высокой жизнеспособности вводимого материала в наших исследованиях был раствор лوماксхлора в концентрации 0,05 %.

Важным фактором, имеющим значение для успешного микроразмножения, является гормональный состав питательной среды и вид экспланта. Решающую роль в этом играют концентрации и сочетание фитогормонов.

Наблюдения показали, что асептические проростки гороха через 7 – 10 дней после посадки на ростовые питательные среды начинали активно расти. На среде без гормонов растения были слаборазвитые, при этом формировался один развитый побег высотой 2,0 – 4,0 см, коэффициент размножения не превышал 1 (табл. 2).

Таблица 2

Влияние гормонального состава питательной среды на рост и развитие растений гороха

№ среды	Состав среды (мг/л)	Развитие в баллах	Высота растения, см	Количество побегов на 1 растение (эксплант), шт	Коэффициент размножения
1	БАП, Гк, Кн по 0,1	3	3 – 6	1 – 2	2
2	БАП, Гк, Кн по 0,2	3	4 – 6	1 – 2	2
3	БАП 0,3 + НУК 0,1	4	2 – 7	1 – 2	3
4	БАП 0,4 + Гк 0,1	4	2 – 6	2 – 3	4
5	БАП 0,5 + ИМК 0,1	5	3 – 6	3 – 6	5
6	БАП 0,5 + ИУК 0,1	5	2 – 6	3 – 6	5
Безгормональная (контроль)	-	3	2 – 4	1	1

На средах № 1 – 4, дополненных БАП, гиббереллином, кинетином и НУК в различных сочетаниях и концентрациях наблюдался активный рост растений, их высота варьировала от 2 до 7 см. Количество побегов на 1 растение достигало трех, экспланты были сильно вытянутыми, поэтому коэффициент размножения был равен 1 – 3.

Отличительной особенностью было то, что на 4 среде с БАП и Гк растения характеризовались более высокой степенью развития, побеги были утолщенные, кустистые. Именно на этой среде коэффициент размножения равнялся 4.

На средах № 5, 6 содержащих БАП, ИМК/ИУК наблюдался интенсивный рост растений не только в высоту, но и хорошее развитие боковых побегов. При этом средняя высота растений составляла 2–6 см. Количество побегов на 1 растение составляло 3–6 штук, коэффициент размножения равнялся 5. Следовательно, с одного введенного на питательную среду проростка можно получить до пяти хорошо развитых растений.

На контроле (среда без гормонов) коэффициент размножения равнялся 1. При этом средняя высота растений составляла 2 – 4 см.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что добавление в питательную среду БАП 0,5 мг/л и ИМК (ИУК) 0,1 мг/л обеспечивает наиболее высокий выход хорошо развитых растений с одного введенного экспланта, что дает возможность использовать для ускоренного микроразмножения гороха в культуре *in vitro* среды № 5, 6. Использование в дальнейшем 3–4 пассажей позволит значительно увеличить данный показатель и получить необходимое для селекционеров количество растений в короткие сроки. Полученные результаты послужат основой для разработки ускоренного вегетативного размножения ценных форм гороха.



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. Из литературных данных известно, что ведущую роль в регуляции ризогенеза играют соединения ауксиновой природы [3, 6]. Механизм действия ауксинов аналогичен и в культуре *in vitro*, хотя условия выращивания изолированных эксплантов специфичны.

В связи с тем, что количество эндогенных ауксинов и ингибиторов в эксплантах не известно, приходится опытным путем подбирать тип экзогенного фитогормона и его концентрацию.

Проведенные исследования на горохе показали, что стимулирующее влияние на корнеобразование оказывала нафтилуксусная кислота в концентрации 0,5 мг/л. Количество укоренившихся эксплантов составляло 30%. Среднее число корней было равно 1-2 штук, 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 активизирует рост надземной части растений после образования корней, однако выход укоренившихся проростков равнялся 15 %. Максимальное образование корней (42%) вызывала НУК в количестве 1,5 мг/л, среднее число корней было равно 2-3 штук, размер составлял 2-3 см. Высота растений колебалась от 3 до 5 см (табл. 3).

Таблица 3

Влияние физиологически активных веществ на формирование корней у клонов гороха

Ростовое вещество	Концентрация, мг/л	Количество введенных эксплантов, шт.	Количество укорененных эксплантов, %	Среднее количество и длина корня, шт; см	Высота растения, см
НУК	0,5	60	30	1-2; 1-2	2-4
	1,0		15		
	1,5		42	2-3; 2-3	
	2,0		2	1-2; 1-2	1-2
ИУК	0,5		0	0	0
	1,0		0	0	0
НУК+ИУК	0,2+0,2		0	0	0
	0,5+0,5		0	0	0
	1,0+1,0		0	0	0
ИМК	1,0		0	0	0
Безгормональная (контроль)	0		0	0	0

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

Выводы

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.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных органов, тканей и клеток растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1970. – 342 с.



2. Внучкова В.В. Методические рекомендации по микроклонированию растений гороха в культуре ткани *in vitro*. – М., 1988. – 15 с.
3. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. – М.: Наука, 1974. – 253 с.
4. Макашева Р.Х. Горох. – Л.: Колос, 1973. – 312 с.
5. Суркова Г.Н. Технологии клонирования зернобобовых и крупяных культур (методические рекомендации) / Г.Н. Суркова, С.В. Бобков, Г.В. Соболева. – М., 2005. – 20 с.
6. Турецкая Р.Х. Эндогенные факторы корнеобразования растений // Биология развития растений. – М.: Наука, 1975. – С. 126-145.

FEATURES MICROPROPAGATION PEAS IN CULTURE *IN VITRO*

T.P. Zhuzhhalova

M.N. Sashchenko

*All-Russia Research Institute of sugar
beet and sugar to them. AL Mazlumov
RAAS, 396 030 Voro-nezh region,
Ramonsky district, VNISS,
8 (47 340) 5-33-27*

*e-mail: vniiss@mail.ru, sama-
ni84@mail.ru.*

The paper presents an improved method for micropropagation of peas, comprising the steps of the sterilization of explants, and their introduction into the conditions *in vitro*, the actual propagation and rooting of regenerants.

Key words: micropropagation, peas, sterilization, tissue culture, rooting.