

Ж. А. Бородаева, аспирант кафедры биологии
В. И. Чернявских, д.с.-х.н., профессор кафедры биологии
Е. В. Думачева, д.б.н., доцент, заведующая кафедры биологии
ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский
университет», Россия, г. Белгород

УДК 633.31.37: 581.143.6

DOI 10.31676/2073-4948-2019-59-19-24

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОТБОРОВ *MEDICAGO VARIA* MART. ДЛЯ УСКОРЕННОГО РАЗМНОЖЕНИЯ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ

Реферат. Изучены приемы введения в культуру *in vitro* и культивирования микроклональным методом индивидуальных отборов люцерны изменчивой для ускоренного размножения и дальнейшей селекционной работы. Установлено, что в культуру *in vitro* можно ввести образцы люцерны, взятые из любой зоны побегов люцерны. Изучение развития эксплантов показало, что образцы, взятые из верхней части растений (40-60 см), хуже развиваются и в большинстве случаев оказываются цветочными почками. Эффективным для введения в культуру люцерны изменчивой для последующего укоренения, является отбор почек из нижней части побега (высотой до 20 см).

Ключевые слова: люцерна изменчивая, *Medicago varia* Mart., *in vitro*, клональное микро-размножение, ускоренное размножение

Summary. The ways of culturing *in vitro* and microclonal cultivation by the method of individual selections of alfalfa, volatile for accelerated reproduction and further breeding work, have been studied. It has been established that specimens of alfalfa taken from any alfalfa shoots zone can be culturing *in vitro*. The study of the development of explants showed that the samples taken from the upper part of plants (40-60 cm) develop worse and in most cases turn out to be flower buds. Effective for culturing of alfalfa volatile for subsequent rooting, is the selection of the buds from the bottom of the shoot (up to 20 cm high).

Keywords: alfalfa volatile, *Medicago varia* Mart., *in vitro*, clonal micropropagation, accelerated reproduction

Введение

Одной из наиболее ценных культур из рода *Medicago*, биологические ресурсы которой широко изучаются и используются в мировой практике, является люцерна. Она имеет полифункциональное значение: источник вы-

Исследование выполнено при поддержке грантов: на проведение НИР по приоритетным направлениям развития агропромышленного комплекса Белгородской области (Соглашение № 2 от 12 ноября 2018 года) на тему: «Формирование селекционно-семеноводческой базы медоносных культур в условиях малых форм хозяйствования»; гранта № 6.4854.2017/БЧ «Развитие научно-образовательного потенциала НОЦ «Ботанический сад НИУ БелГУ» как модельной площадки для внедрения инноваций в научной, образовательной и профориентационной работе».

сокобелкового корма для сельскохозяйственных животных, ценное сырье для фармацевтической промышленности, перспективный медонос с полезными и питательными качествами, способствует улучшению почв и повышению их плодородия, а также является важнейшим компонентом экосистем Центрально-Черноземного региона (ЦЧР) [1-9].

Клональное микроразмножение *in vitro* позволяет в короткие сроки размножать ценные генотипы, что можно использовать как непосредственно в производстве, так и для ускорения селекционного процесса [10, 11].

Большое значение для процесса укоренения, по данным исследований хвойных растений, имеет расположение веток, с которых взяты черенки [12, 13].

Люцерна — культура, которую в мире активно размножают *in vitro*, особенно в США, где ежегодно путем клонального микроразмножения получают до 30-40 новых сортов [14]. Однако все методики, связанные с промышленным размножением культуры, защищены авторским правом. В связи с этим введение индивидуальных отборов люцерны в культуру *in vitro* требует дополнительного изучения.

Цель работы — изучить особенности введения в культуру *in vitro* и культивирования микроклональным методом индивидуальных отборов *M. varia* Mart. для ускоренного размножения и дальнейшей селекционной работы.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2018-2019 гг. на базе лаборатории биотехнологии растений НОЦ «Ботанический сад НИУ БелГУ». В работе применяли общепринятые методы культуры клеток и тканей. В исследованиях использовали модифицированные среды, которые содержали макро-, микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [15]. Объектом служили растения люцерны, отобранные по комплексу хозяйственно-ценных признаков. Выборка состояла из особей с ярко выраженной *mf*-мутацией. У растений в фазу плодообразования отбирали почки в трех различных зонах:

- в нижней части стебля (на высоте 20 см);
- в средней части стебля (на высоте 20-40 см);
- в верхней части стебля (на высоте 40-60 см).

В каждом варианте опыта на первом этапе было взято 30 эксплантов зеленых черенков.

Стерилизацию образцов проводили в соответствии с методическими требованиями [15], модифицированной лабораторией биотехнологии растений НОЦ «Ботанический сад НИУ БелГУ». Была использована многоступенчатая схема стерилизации. В асептических условиях образцы проводили через растворы перманганата калия в течение 20 минут и фундазола в течение

10 минут. Далее в стерильных условиях образцы обрабатывали раствором белизны (1:1) в течение 3 минут. Промывали в автоклавированной дистиллированной воде и помещали на агаризированную среду MS с добавлением гормона (БАП — 1 мл/л). Сосуды с тканями переносили в культуральную комнату. Экспланты инкубировали при 16-часовом фотопериоде, освещенности 2000 лк, температуре +23 °С. Пассаж введения длился 4 недели. При учете отмечали бактериальные и грибковые заражения, количество стерильных и жизнеспособных эксплантов. Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного программного обеспечения Microsoft Excel 2010 с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Было важно определить, из какой зоны следует отбирать материал для последующего размножения и введения в культуру селекционных образцов люцерны. При этом количество стерильных эксплантов из почек, взятых из верхней части растений, составило 26,68 шт., из средней части — 24,31 шт., из нижней — 21,33 шт. У образцов, отобранных в нижней части побегов, было выявлено 3,33 эксплантов, зараженных бактериями, и 6,67 с выявленным грибковым поражением (табл. 1).

Таблица 1.

Результаты введения люцерны изменчивой (*M. varia* Mart.) в культуру *in vitro*

Зона отбора почек	Количество эксплантов, шт.		
	Стерильных	Бактериальное заражение	Грибковое заражение
В	26,68*	0,66*	3,00*
С	24,31*	2,00*	5,00*
Н	21,33*	3,33*	6,67*

Примечание: * — различия достоверны при уровне значимости $p < 0,05$. Зоны отбора почек: В — взятые из верхней части растений (на высоте 40-60 см), С — взятые из средней части растений (на высоте 20-40 см), Н — взятые из нижней части растений (на высоте 20 см)

Изучение развития эксплантов показало, что образцы, взятые из верхней части побега, оказались цветочными почками. В течение двух первых недель на образцах, взятых из средней и верхней части побегов начали распускаться цветочные почки. В образцах из нижней части побегов цветочные почки не формировались.

Спустя 4 недели была проведена оценка жизнеспособности эксплантов. В среднем жизнеспособность эксплантов в опыте изменялась от 53,3 до 90,0 %. На 100 % стерильными оказались два образца. Микозы были отмечены у 36,3 %,

бактериальное заражение — у 54,5 % опытных образцов. При этом количество стерильных жизнеспособных эксплантов находилось в диапазоне от 53,3 до 80,0 %.

Скорость роста эксплантов в опыте была различной. Установлено, что экспланты, полученные из почек, взятых из верхней части побегов люцерны, почти не росли — их высота изменялась от 1,0 до 1,5 см (табл. 2). Высота эксплантов из почек, взятых из нижних и средних частей растений, достигала 5,0-10,0 см. Также количество междоузлий (достоверно различимых) было максимальным у образцов нижних частей растения (до 6 междоузлий).

Таблица 2.

Развитие эксплантов люцерны в условиях *in vitro* через 4 недели культивирования

Показатели	Зона отбора почек		
	В	С	Н
Высота эксплантов, см	1,2 ±0,2	2,1 ±0,4	6,3 ±0,5*#
Количество цветочных почек, шт.	12,0	2,0	0
Количество стеблей, шт.	1,0 ±0,0	1,0 ±0,0	1,7 ±0,6*#
Количество междоузлий, шт.	1,6 ±0,5	2,2 ±0,3	3,9 ±0,9*#
Длина корней, см	0	0	0,55 ±0,05

Примечание: * — различия достоверны В по отношению к Н при уровне значимости $p < 0,05$; # — различия достоверны С по отношению к Н при уровне значимости $p < 0,05$. Зоны отбора почек: В — взятые из верхней части растений (на высоте 40-60 см), С — взятые из средней части растений (на высоте 20-40 см), Н — взятые из нижней части растений (на высоте 20 см)

Только экспланты, взятые из почек нижней части маточного растения, образовывали несколько стеблей (1,7 шт. на эксплант) и корни (0,55 см).

У эксплантов, взятых из верхней и средней части побегов, был отмечен интенсивный процесс каллусообразования, но отсутствовал процесс образования корней. У эксплантов, взятых из нижней части побегов, в 20 % случаев формировались корни.

Выводы

Анализ данных позволил установить, что в культуру *in vitro* можно ввести образцы люцерны, взятые из любой зоны побега. Однако образцы, взятые из верхней и средней части растений (20-60 см) хуже развиваются и в большинстве случаев оказываются цветочными почками. Эффективным для введения в культуру люцерны, изменчивой для последующего размножения, является отбор почек из нижней части побега (до 20 см) в период плодообразования. По данной схеме было получено от 53,3 до 80,0 % стерильных жизнеспособных эксплантов.

Список использованной литературы

1. **Косолапов В. М.**, Пилипко С. В., Костенко С. И. Новые сорта кормовых культур — залог успешного развития кормопроизводства // Достижения науки и техники АПК, 2015. — № 4. — С. 35–37.
2. **Савченко И. В.** Выведение новых сортов и гибридов сельскохозяйственных растений // Вестник РАН, 2017. — Т. 87. — № 4. — С. 325–332.
3. **Lamb J. F. S.**, Sheaffer C. C., Rhodes L. H., Sulc R. M., Undersander D. J., Brummer E. C. Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence and nutritive value // Crop Science, 2006. — V. 46. — P. 902–909.
4. **Ivanova N.**, Pavlyuchik E., Ambrosimova N., Panteleeva T., Epifanova N. Formation of productivity of pasture agrophytocenosis designed based on perennial ryegrass and festulolium under drained soils of upper Volga // Nauka i studia, 2015. — V. 7. — P. 48–58.
5. **Dumacheva E. V.**, Cheriavskih V. I. Particular qualities of micro evolutionary adaptation processes in cenopopulations *Medicago* L. On carbonate forest-steppe soils in European Russia // Middle East Journal of Scientific Research, 2013. — V. 17. — № 10. — P. 1438–1442.
6. **Dumacheva E. V.**, Cherniavskih V. I., Markova E. I., Klimova T. B., Vishnevskaya E. V. Spatial pattern and age range of cenopopulations *Medicago* L. In the conditions of gullying of the southern part of the central Russian Upland // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2015. — V. 6. № 6. — P. 1425–1429.
7. **Dumacheva E. V.**, Cherniavskih V. I., Gorbacheva A. A., Vorobyova O. V., Borodaeva Z. A., Bepalova E. N., Ermakova L. R. Biological resources of the Fabaceae family in the cretaceous south of Russia as a source of starting material for drought-resistance selection. International Journal of Green Pharmacy, 2018. — V. 12. — №. 2. — P. 354.
8. **Шишела Т. А.** Технология возделывания люцерны на семена на орошаемых землях северного Прикаспия // Альманах современной науки и образования, 2007. — № 6 (6). — С. 147–149.
9. **Lisetskii F. N.**, Chernyavskih V. I., Degtyar O. V. Pastures in the Zone of Temperate Climate: Trends of Development, Dynamics, Ecological Fundamentals of Rational Use // Pastures: Dynamics, Economics and Management. USA, NovaSciencePublishers, Inc., 2011. — P. 51–85.
10. **Строева Н. С.**, Дарханова В. Г., Воронов И. В., Филиппова Г. В. Клональное микро-размножение и селекция *Medicago varia* в условиях Центральной Якутии // Наука и образование, 2017. — № 3. — С. 124–129.
11. **Шамсутдинов З. Ш.** Селекция кормовых культур: достижения и задачи // Сельскохозяйственная биология, 2014. — № 6. — С. 35–46.
12. **Матраимов М. Б.** Теоретические и практические аспекты черенкования «Теоретические и практические аспекты черенкования» хвойных пород древесных растений // Известия ВУЗов (Кыргызстан), 2005. — 6. — С. 158–159.
13. **Кентбаев Е. Ж.**, Жумагулов Ж. Ж. Вегетативное размножение ели колючей на юго-востоке Казахстана // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений, 2011. — Т. XIV. — С. 52–55.

14. **Small E.** Alfalfa and relatives: evolution and classification of Medicago. NRC ResearchPress, Ottawa, Ontario, Canada. 2011. — 727 pp.

15. **Муратова С. А.,** Шорников Д. Г., Янковская М. Б. Размножение садовых культур *in vitro*: метод. рекоменд. — Мичуринск-Наукоград, 2008. — 69 с.

Zh. A. Borodaeva, V. I. Chernyavskikh, E. V. Dumacheva
Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

**STUDYING THE PECULIARITIES OF CULTURING *IN VITRO* INDIVIDUAL
SELECTIONS OF *MEDICAGO VARIA* MART. FOR ACCELERATED
REPRODUCTION OF BREEDING SPECIMENS**