

ods. **Results.** In anther culture of rice the sterilization conditions of explants, the optimal time were tailored. The culture media for callus induction and for subsequent regeneration was tested. The 779 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** To increase the formation of embryo like structures in anther culture of rice panicles should be incubated for the pretreatment in water at 8-10°C during 6-7 days. The simultaneous use of two culture media MC: 1) with the addition of 1 mg / l BAP and 0.5 mg / L NOC, 2) with the addition of 2 mg / l kinetin and 0.5 mg / L NAA promotes by formation of maximum number of green plants-regenerants.

*Key words:* rice hybrids, anther culture *in vitro*, double haploid.

**ЗАРДИНОВА Г.Р., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.**

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского  
Россия, 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ГИПОКОТИЛЯ РАЗНЫХ СОРТОВ УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*)**

Разработка системы регенерации и трансформации люпина, как одной из важных кормовых культур, в настоящее время является актуальной проблемой. Получение трансгенных форм люпина позволит в дальнейшем создать новые сорта, устойчивые к антракнозу – широко распространившемуся грибному заболеванию, которое значительно снижает урожайность люпина [1]. При этом успешная трансформация невозможна без разработки приемов культивирования *in vitro* и получения растений-регенерантов [2].

Решением проблемы регенерации люпина *in vitro* занимались российские и зарубежные ученые [2-11]. Исследовалось влияние различных гормонов и состава питательных сред на регенерацию люпина *in vitro*, изучался регенерационный потенциал различных типов эксплантов. Так, Daza & Chamber получили регенерацию жизнеспособных растений на эксплантах из гипокотилей люпина желтого [4]. В 1997 году Molvig с сотрудниками получили прямой стеблевой морфогенез из меристематических тканей незрелых зародышей люпина на модифицированной среде MS [5]. В работе Костюченко Д.А. (Брянская государственная инженерно-технологическая академия) показано положительное влияние гибберелловой кислоты на раз-

витие побегов и дальнейшее укоренение регенерантов люпина, предложены схемы введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей, верхушечных и пазушных почек трех видов люпина [6, 7]. В лаборатории молекулярной биологии Института проблем химической физики РАН был разработан метод клонального микроразмножения из пазушных почек проростков люпина узколистного на среде MS с концентрацией БАП 0,5 мг/л. Показано, что добавление ИМК в питательную среду на этапе размножения повышает эффективность ризогенеза микропобегов люпина после 3-6 пассажей [8].

Как и у многих бобовых, у люпина способность к регенерации *in vitro* во многом определяется генотипом, что является одной из причин низкой воспроизводимости разрабатываемых систем регенерации и трансформации. Наличие сортовой специфичности люпина при культивировании *in vitro* делает необходимым выявление сортов с наибольшим морфогенным потенциалом и объясняет актуальность оптимизации условий регенерации применительно к конкретным видам и сортам люпина.

В данной работе на сортах люпина узколистного селекции ВНИИ люпина нами изучено влияние экзогенных фитогормонов на регенерацию *in vitro* растений из ткани гипокотилей.

#### **Материалы и методы**

Работу проводили на 5 сортах люпина узколистного (*Lupinus angustifolius*): Белозерный 110, Кристалл, Снежень, Витязь, Смена. Семенной материал предоставлен ВНИИ люпина.

Для введения в культуру *in vitro* были использованы экспланты, изолированные из гипокотилей проростков люпина 3-4-дневного воз-

раста. Стерилизация исходного материала проводилась по следующей схеме: семена промывали проточной водой, затем их выдерживали 10 мин в концентрированной серной кислоте, что способствовало снятию твердокаменности семян и индукции прорастания, после чего семена промывали пятикратно стерильной дистиллиро-

ванной водой. Затем семена проращивали в асептических условиях на влажном фильтре при 22°C. Из полученных 3-4-дневных проростков выделяли экспланты – отрезки гипокотилей (поперечно и продольно срезанные) длиной около 2-3 мм, которые помещали на агаризованную питательную среду. Первые 10 дней проводили темновую преинкубацию эксплантов, затем их культивировали на свету при 22°C и 16-часовом

фотопериоде. Продолжительность пассажа составляла 3 недели.

Были использованы питательные среды, содержащие половинные концентрации минеральных компонентов по прописи Мурасига-Скуга ( $\frac{1}{2}$ MS) и витамины по прописи Гамборга (B<sub>5</sub>) (концентрация аскорбата 25 мг/л). Концентрация сахарозы составляла 30 г/л, концентрация агара – 0,7%.

### Результаты и обсуждение

В индукции регенерации растений *in vitro* ключевую роль играют фитогормоны и их синтетические аналоги, а именно цитокинины в сочетании с ауксинами. В данной работе сравнивали действие различных регуляторов роста: цитокининов – тидиазурона (ТДЗ) и 6-бензиламинопурина (БАП), ауксинов –  $\beta$ -

индолилуксусной кислоты (ИУК) и 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). В 3-х вариантах был использован гормон стресса – абсцизовая кислота (АБК) в сочетании с БАП и ИУК. Концентрации фитогормонов и их сочетания приведены в таблице 1.

Таблица 1. Варианты гормонального состава питательных сред для регенерации *in vitro* люпина узколистного

Номер варианта	Питательная среда	Фитогормоны (мг/л)				
		БАП	ИУК	ТДЗ	НУК	АБК
1	$\frac{1}{2}$ MS	0,5	1	-	-	-
2	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	-
3	$\frac{1}{2}$ MS	2	1	-	-	-
4	$\frac{1}{2}$ MS	4	1	-	-	-
5	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	0,3	0,2	-
6	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	0,5	0,2	-
7	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	1	0,2	-
8	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	1,5	0,2	-
9	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	0,5
10	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	1,5
11	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	3

Полученные результаты показали, что на среде  $\frac{1}{2}$ MS, содержащей ТДЗ в диапазоне концентраций 0,3-1,5 мг/л, наблюдался активный каллусогенез без морфогенеза. На поверхности экспланта образовался бледно-желтый каллус средней плотности, по краям и в середине экспланта – каллус зеленого цвета. Сортные различия не наблюдались.

На среде с АБК также получен только каллусогенез, причем при концентрации 3 мг/л замечено меньше очагов каллусообразования, чем при 0,5 мг/л АБК. Каллус большей частью белого цвета, в середине экспланта – светло-зеленого. На некоторых эксплантах был отмечен ризогенез.

На среде  $\frac{1}{2}$ MS с БАП и ИУК по краям эксплантов наблюдалось образование рыхлого белого каллуса, в середине эксплантов – более

плотного, светло-зеленого. Было замечено, что процессы каллусогенеза у всех сортов люпина шли более интенсивно на среде с 0,5-1 мг/л БАП.

Кроме того, у 3-х сортов люпина в этом варианте опыта было получено стеблеобразование. При концентрации БАП 0,5 мг/л наблюдался первичный стеблевой морфогенез только у сорта Снежить с частотой 16,7 %. У этого же сорта развитие побегов было отмечено и на среде с 2 мг/л и 4 мг/л БАП (рис. 1, А). У сортов Кристалл и Витязь регенерация побегов наблюдалась при концентрации БАП 2 и 4 мг/л (табл. 2). Следует отметить, что побеги на среде с БАП 2-4 мг/л слабо развивались, были укороченные, быстро витрифицировались. Возможно, высокие концентрации БАП оказывают негативное влияние на морфологию побегов.

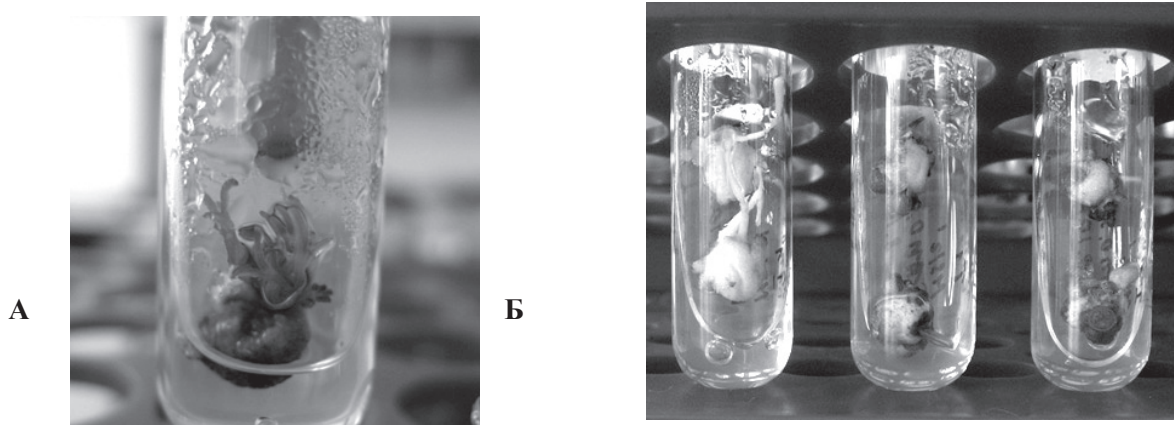


Рис. 1. Экспланты из гипокотилей люпина узколистного: **А** – сорт Снежень, стеблевой морфогенез на среде с 2 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК; **Б** – сорт Белозерный 110, корневой морфогенез на среде с 0,5 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК

Таблица 2. Влияние концентрации БАП в питательной среде на процент побегообразования на эксплантах из ткани гипокотилей люпина узколистного

Сорта люпина	Концентрация фитогормонов, мг/л			
	0,5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	2 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	4 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК
Белозерный 110	0	0	0	0
Кристалл	0	0	16,7	8,3
Снежень	16,7	0	16,7	8,3
Витязь	0	0	8,3	0
Смена	0	0	0	0

На питательных средах с низкими концентрациями БАП (0,5-1 мг/л) на эксплантах был отмечен ризогенез (рис 1, Б). Наибольшей способностью к корнеобразованию обладали экспланты сорта Белозерный 110 (рис. 2). На среде

с 4 мг/л БАП корней не было. Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокие концентрации БАП в среде культивирования подавляют корнеобразование.

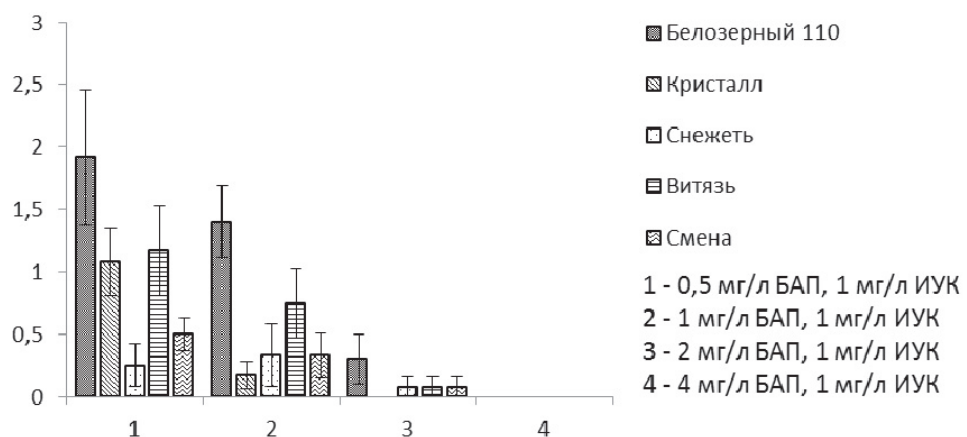


Рис. 2. Влияние концентрации БАП в культуральной среде на ризогенез эксплантов из гипокотилей люпина узколистного

При дальнейшем культивировании каллусной ткани вторичный морфогенез не был получен ни в одном варианте опыта, что подтверждает от-

меченную другими авторами сложность получения непрямого органогенеза в культуре ткани большинства бобовых, и в частности люпина [12].

## Выводы

Таким образом, можно сделать вывод о том, что среди исследованных сортов люпина узколистного наибольшую способность к морфогенезу в культуре *in vitro* проявили сорта Кристалл и Снежеть. Наиболее подходящей для

регенерации побегов на explантах гипокотили оказалась питательная среда с 2 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК. Полученные результаты могут являться основой для дальнейшей разработки системы регенерации люпина узколистного.

## Литература

1. Такунов И. П. Люпин – настоящее и будущее // 20 лет Всероссийскому научно-исследовательскому институту люпина: сб. науч. трудов. – Брянск. – 2007. – С. 15-41.
2. Фоменко Т.И., Малюш М.К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного // Физиология и биохимия культ. растений. – Киев. – 2010. – Т. 42, №4. – С. 306-314.
3. Фоменко Т.И., Малюш М.К., Заякин В.В., Нам И.Я. Морфогенетический потенциал тканей люпина узколистного в культуре *in vitro* // Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Брянск. – 2010. – С. 129-135.
4. Daza A. & Chamber M.A. Plant regeneration from hypocotyl segments of *Lupinus luteus* cv. L. Aurea // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 34. – P. 303-305.
5. Molvig L., Tabe L.M., Eggum B.O. et al. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius*L.) expressing a sunflower seed albumin gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 8393-8398.
6. Костюченко Д. А. Биотехнологические приемы расширения исходного материала для селекции люпина // Автореф. диссерт. на соискание ученой степени канд. сел.-хоз. наук. – Брянск. – 2004.
7. Костюченко В.И., Костюченко Д.А., Пигарева С.А., Яговенко Т.В. Развитие незрелых зародышей трех видов люпина на различных питательных средах // Биологический и экономический потенциал зернобобовых и крупяных культур и пути его реализации. – Орел. – 1999. – С. 136-142.
8. Балакина А.А. Влияние условий культивирования *in vitro* на морфогенные процессы и активность ферментов антиоксидантной системы в растениях люпина узколистного// Автореф. диссерт. на соискание ученой степени канд. биол. наук. – Москва. – 2012.
9. Добровольский С.А., Кубарев В.С., Шишлов М.П. Получение регенерантов люпина в культуре *in vitro* // Генетика и биотехнология 21 века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы Международной научной конференции. – Минск. – 2008. – С. 71-73.
10. Полякова М.Н., Балакина А.А., Мартиросян Ю.Ц., Диловарова Т.А., Кособрюхова А.А. Морфогенез растений рода *Lupinus in vitro* и изучение влияния света различного спектрального состава на рост, развитие и регенерационный потенциал растений // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Брянск. – 2009. – С. 205-208.
11. Pniewski T., Kapusta J., Legocki A.B. *In vitro* micropropagation of four lupin species // Acta Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 24, № 4. – P. 417-424.
12. Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M. Recent Advances in Legume Transformation // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 131. – P. 892-899.

## ZARDINOVA G.R., ZAYAKIN V.V., NAM I.YA.

Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky  
Russia, 241036, Bryansk, Bezhitskaya str., 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru

## THE INFLUENCE OF PLANT HORMONES ON MORPHOGENESIS OF *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* HYPOCOTYLS EXPLANTS

**Aim.** Lupin, like many legume crops, shows high sensitivity to conditions *in vitro*. Therefore, we studied the effects of different plant hormones on the shoot regeneration from tissues of lupine hypocotyls. **Methods.** Explants of aseptic lupine seedlings cultivated on a ½ Murashige and Skoog basal medium with different hormonal composition. **Results.** Direct morphogenesis was obtained in 3 out of 5 varieties of lupine explants on MS basal medium with 6-benzilaminopurine. **Conclusions.** Lupine hypocotyl tissue can be used for development of system for lupin regeneration.

**Key words:** *Lupinus angustifolius*, hypocotyls, callus, direct morphogenesis, rhizogenesis.