

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ
В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ
И ТКАНЕЙ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО
(*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.)

А.А. БАЛАКИНА¹, ЕА. КАЛАШНИКОВА²

(¹ Институт проблем химической физики РАН;

² РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В статье обсуждается вопрос о влиянии регуляторов роста растений на морфогенез люпина узколистного в культуре *in vitro*. Показано, что наибольшее количество микропобегов без видимых изменений в морфологии формировалось в присутствии 2,25 мкМ 6-БАП и 4,5 мкМ ИМК. Разработанный протокол может быть использован для проведения агробактериальной трансформации люпина узколистного и регенерации трансгенных растений.

Ключевые слова: люпин узколистный, морфогенез, регуляторы роста растений, изолированные экспланты, *in vitro*.

Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.) благодаря высокому содержанию белка в семенах и зеленой массе является ценной кормовой культурой. Селекционные работы по люпину направлены на получение скороспелых, низкоалкалоидных, высокоурожайных сортов со сбалансированным аминокислотным составом, пригодных к технологическим операциям, устойчивых к болезням и вредителям. Одним из путей ускорения селекционного процесса является сочетание методов классической селекции и биотехнологии.

Люпин, как и большинство бобовых культур, считается сложным объектом исследований в культуре *in vitro* в связи с низким морфогенетическим потенциалом культивируемых эксплантов, что не позволяет использовать предлагаемые технологии в дальнейших исследованиях, например, по генетической инженерии [2, 4]. Кроме того, полученные *in vitro* растения-регенеранты люпина обладают низкой способностью к укоренению, которая составляет не более 27% [5].

Таким образом, является актуальным оптимизировать условия культивирования изолированных органов и тканей люпина узколистного с целью повышения морфогенетической активности изолированных эксплантов на разных этапах клонального микроразмножения.

Методика

В работе использовали сорта и образцы люпина узколистного: Ладный, Деко, Куршавель, Миртан. В качестве первичного экспланта использовали: 1) пазушные почки с семядолей и сегментом зародышевой оси; 2) верхушечные почки, изолированные с 3-суточных проростков.

Экспланты культивировали на агаризованной питательной среде, содержащей микро- и макроэлементы по прописи Мурасиге-Скуга [3] и витамины по прописи Гамборга [1], 58,43 мМ сахарозы, 0,8% агара (Vacto-Agar). В качестве регуляторов роста использовали 6-бензиламинопурин (6-БАП), кинетин (КИН), индолилмасляную кислоту (ИМК) и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в различных концентрациях и комбинациях. Первичные экспланты и микропобеги культивировали в световой комнате при интенсивности света 5000 лк, 16-часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Продолжительность пассажа составляла 14 сут.

Опыты проводили в четырехкратной повторности. Данные экспериментов представлены в виде $\bar{x} \pm t_{05} \cdot S_{\bar{x}}$, где \bar{x} — среднее значение, $S_{\bar{x}}$ — ошибка средней, t_{05} — значение критерия Стьюдента. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле $K = M_2/M_1$, где M_2 — среднее геометрическое образовавшихся мериклонов за шесть пассажей, M_1 — среднее геометрическое исходных мериклонов за шесть пассажей.

Результаты и их обсуждение

На этапе введения в культуру наши исследования были направлены на выявление оптимальных условий для эффективной первичной регенерации и дальнейшего роста регенерантов. Исследования показали, что использование в качестве первичного экспланта верхушечных почек позволяет получать только один побег, в то время как из пазушных почек формируется, как правило, 2-4 побега, и эффективность регенерации растений составляет в среднем 93,3%. По-видимому, семядоли являются дополнительным источником питательных веществ и оказывают влияние на более быстрое формирование побегов. Продолжительность образования побегов составляет 14 сут. Существенных различий по эффективности регенерации между исследуемыми генотипами нами не было отмечено, что обуславливает возможность их применения для получения стабильной регенерации побегов из почек.

Другим подходом к увеличению регенерационного потенциала зернобобовых культур *in vitro* является культивирование сегментов незрелых зародышей [6]. В нашей работе в качестве первичных эксплантов были использованы семядоли с пазушной почкой, изолированные из незрелых зародышей на стадии восковой спелости. В питательную среду добавляли различные концентрации КИН и 6-БАП. Наилучшие результаты были получены в вариантах с присутствием КИН в концентрации 1,13 мкМ или 6-БАП в концентрации 2,25 мкМ, существенных различий по регенерационной способности между сортами и типами первичных эксплантов не наблюдали (рис. 1).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что наиболее предпочтительным источником первичных эксплантов являются трехсуточные проростки люпина, поскольку в отличие от незрелых зародышей их легче получать из семян без выращивания донорных растений в теплице. Кроме того, пазушные почки с семядолей и фрагментом зародышевой оси являются оптимальным первичным эксплантом при клональном микроразмножении, а также для проведения дальнейших исследований по агробактериальной трансформации люпина узколистного.

Известно, что люпин узколистный, как и другие бобовые культуры, требователен к составу питательной среды. При культивировании микрорастений люпина *in vitro* обычно используют высокие концентрации 6-БАП, которые, как правило, приводят к появлению ряда нежелательных эффектов, таких как снижение регенерационной способности, витрификация, карликовость и потеря способности к корневому

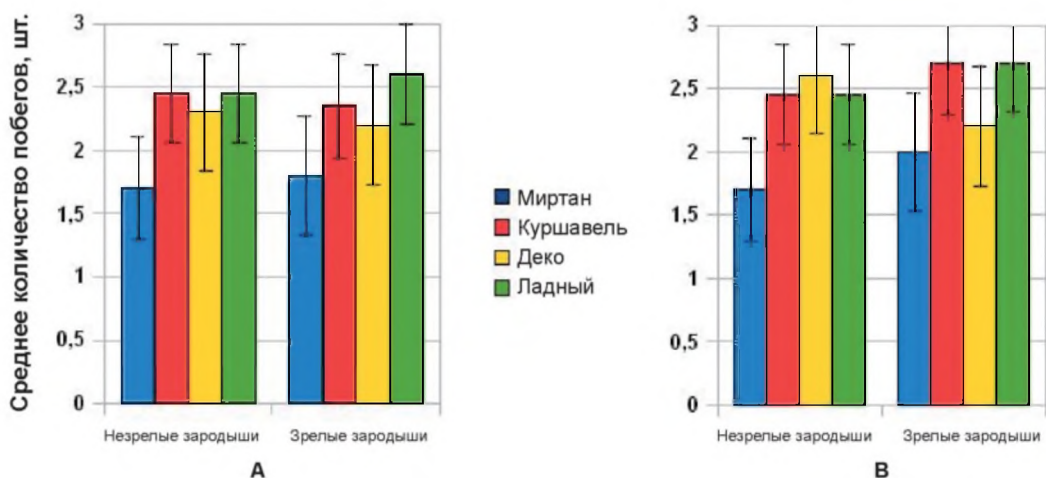


Рис. 1. Среднее количество побегов с одного экспланта, шт.: А — в присутствии 1,13 мкМ кинетина, В — в присутствии 2,25 мкМ 6-БАП

органогенезу [5]. На этапе микроразмножения было изучено влияние КИН и 6-БАП в концентрациях от 0,45 до 6,75 мкМ на эффективность регенерации (рис. 2).

Установлено, что использование 6-БАП в концентрации 2,25 мкМ приводило к формированию витрифицированных побегов, в то время как применение 6-БАП в концентрации 4,5 мкМ — к образованию каллусной ткани. Наиболее быстрое развитие побегов из пазушных почек наблюдали в вариантах без добавления регуляторов роста (10-12 сут.), при повышении концентрации КИН и 6-БАП до 2,25 мкМ время развития побегов увеличивалось до 14-15 сут., а при использовании более высоких концентраций — до 20-22 сут.

Таким образом, для получения первичной регенерации из пазушных почек люпина узколистного наиболее оптимальной является питательная среда на осно-

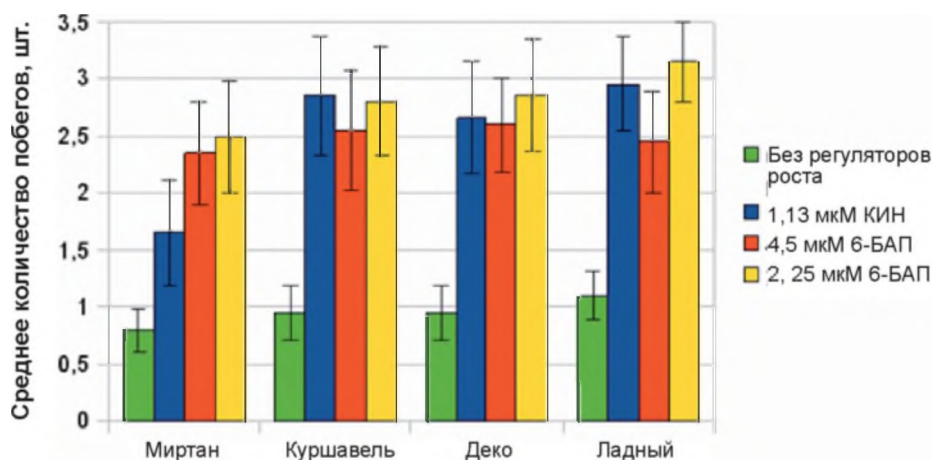


Рис. 2. Эффективность регенерации люпина узколистного

ве минеральных солей по Мураснге-Скугу с добавлением витаминов по Гамборгу и 2,25 мкМ 6-БАП или 1,13 мкМ КИН.

Одной из целей клонального микроразмножения является получение максимального количества мериклонов, характеризующихся быстрым ростом и правильной морфологией. В наших исследованиях оценивали влияние питательных сред различного гормонального состава на количество и качество растений-регенерантов люпина узколистного (рис. 3).

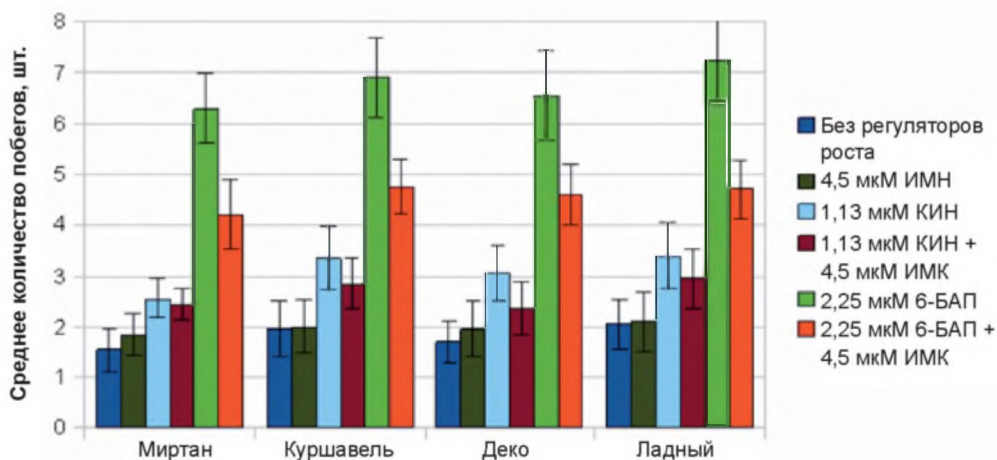


Рис. 3. Эффективность микроразмножения различных сортов люпина узколистного

Установлено, что увеличение концентрации 6-БАП в питательной среде более 2.25 мкМ стимулировало развитие 9-15 микропобегов на одном экспланте. Однако повышение концентрации оказалось неэффективным, поскольку регенераты были витрифицированы и впоследствии погибали. При культивировании микрорастений люпина в течение двух пассажей в присутствии 6-БАП или КИН в концентрации 2.25 мкМ также были выявлены изменения в морфологии побегов и отмечено снижение общего количества мериклонов.

На этапе микроразмножения для исследуемых генотипов люпина узколистного наиболее оптимальной была среда, содержащая 2,25 мкМ 6-БАП и 4,5 мкМ ИМК, на которой формировалось наибольшее количество микропобегов без видимых изменений их морфологии. Следует отметить, что использование данного протокола позволяет получать в течение 6 пассажей от 3888 до 10277 шт. микрорастений, которые после длительного культивирования в условиях *in vitro* сохраняют способность к укоренению. Полученные нами данные по ризогенезу (25,0-33,3%) были существенно выше результатов, полученных другими авторами для регенератов люпина узколистного (10-13,3%) [5].

Выводы

1. Разработанные протоколы регенерации позволяют проводить клональное микроразмножение исследуемых генотипов люпина узколистного в течение шести пассажей при индукции побегообразования из пазушных почек.

2. Введение в состав питательной среды 4,5 мкМ ИМК позволяет избежать негативного влияния 6-БАП на морфологию и ростовые показатели микрорастений люпина узколист-

ного. Такой подход исключает этапы культивирования микрорастений на безгормональной питательной среде и дает возможность получать большее количество мериклонов при одинаковом числе пассажей.

3. Показана возможность индукции ризогенеза у микрорастений люпина узколистного после трех пассажей культивирования в присутствии ИМК, что исключает из технологии трудоемкую процедуру прививки побегов.

Библиографический список

1. *Gamborg O., Miller R., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp Cell Res.*, 1968. 50:151-158.

2. *Molving L., Tabe L., Eggum B.O., Moore A.E., Craige S., Spencer D., Higgins T.J.V.* 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. 94:8393-8398.

3. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures//*Physiol Plant.*, 1962. 15:473-497.

4. *Pigeaire A., Abernethy D., Smith P.M., Simpson K., Fletcher N., Lu C., Atkins C.A., Cornish E.* Transformation of grain legume (*Lupinus angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices//*Molecular Breeding*, 1997. 3:341-349.

5. *Pniewski T., Kapusta J., Legocki A.B.* In vitro micropropagation of four lupin species // *Acta Phisiol Plant*, 2002. 24:417-424.

6. *Popelka J.C., Gollasch S., Moore A., Molving L., Higgins T.J.V.* Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny // *Plant Cell Rep.*, 2006. 25:304-312.

Рецензент — д. с.-х. н. О.Н. Аладина

SUMMARY

Effect of growth regulators on narrow-leaved lupine morphogenesis in vitro is considered in the article. The presence of 6 - BAP (2.25 μ M) and IBA (4.5 μ M) has been found to provide the highest multiplication ratio. The protocol worked out can be used for agro-bacterial transformation in narrow-leaved lupine and transgenic plants regeneration.

Key words: narrow-leaved lupine, morphogenesis, growth regulators, isolated explants, in vitro.

Балакина Анастасия Александровна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ИПХФ РАН (142432, Московская область, г. Черноголовка, просп. Академика Семёнова, д. 1; e-mail: stasya.balakina@gmail.com).

Калашникова Елена Анатольевна — д.б.н., профессор кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: kalaslmikova(@,timacad.ru).