

УДК 633.31:58.085:631.527:581.2

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФОРМ ЛЮЦЕРНЫ, УСТОЙЧИВЫХ К ФУЗАРИОЗУ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ КАЛЛУСОВ И КЛЕТОК**

**С.Е. МАСЛЕННИКОВ, Г.С. ПОСЫПАНОВ, А.В. МЕЗЕНЦЕВ**

(Кафедра растениеводства)

**Разработана схема получения устойчивых к фузариозу форм люцерны с использованием культуры каллусов и клеток, которая включает 4 основных этапа.**

**Получены растения-регенеранты из сортов люцерны Славянская местная, Донская 2, Северная гибридная 69, Марусинская 425, сортообразцов К-2, 3-8с, 675/19. По регенерационной способности изученные генотипы разделены на 2 группы: морфогенные каллусы образуются при низких концентрациях гормонов 2,4-Д и кинетина (по 0,2—0,5 мг/л) и высоких их концентрациях (по 4-8 мг/л). Наиболее морфогенный каллус образуется на среде МБ5+(2,4-Д и кинетин, по 2—8 мг/л). В качестве регенерационной среды используется среда № 6+(2,4-Д и кинетин, по 0,2 мг/л). Образование эмбрионидов в жидких средах усиливается после накопления определенного их количества.**

Использование методов культуры каллусов и клеток при создании форм люцерны, устойчивых к фузариозу, повышает эффективность селекционной работы. Люцерна относится к числу немногих сельско-

хозяйственных культур, для которых определены основные факторы, влияющие на процесс морфогенеза, и получены растения-регенеранты из тканей, клеток и протопластов. Впервые регенерацию рас-

тений люцерны из каллусной ткани осуществили американские ученые [13]. Была показана определяющая роль 2,4-Д в инициации морфогенетических изменений в культуре ее ткани. Важное значение имеет также и размер культивируемых клеточных агрегатов. Необходима определенная критическая масса, способная реагировать на тот или иной морфогенетический стимул [15]. Регенерация растений люцерны наблюдалась как при низких концентрациях гормонов в каллусогенных средах [8], так и при повышенных концентрациях 2,4-Д и кинетина в первичных средах [4, 12, 14].

Для учета роста каллусов обычно пользуются прямым взвешиванием каллусной массы. В то же время применяют и ряд косвенных методов: замер диаметра [9], сравнение каллусов с пластилиновыми или глиняными моделями [11], взвешивание каллусов, сходных по размеру и форме [3].

Опыты по отбору устойчивых к фузариозу форм люцерны на клеточном уровне были проведены американскими [10], итальянскими [7] и отечественными [2, 5, 6] исследователями. Отбор устойчивых клеточных линий осуществляли на уровне каллусов, клеточных суспензий и протопластов. В качестве селективных объектов использовали культуральные фильтраты, чистые токсины патогенов или их смеси с целлюлозами и пектиназами. Однако у обоих селективных агентов есть определенные недостатки. В случае культуральных фильтратов сложно подобрать необходимые концентрации, при этом большие объемы посторонних питательных веществ снижают эффективность морфогенеза.

Применение отдельных токсинов исключает влияние всего комплекса веществ, выделяемых грибами и действующих на растения. Следовательно, задача состоит в том, чтобы снизить до минимума недостатки данных селективных агентов.

До настоящего времени многие аспекты регенерации растений и отбора клеток на селективных средах с метаболитами грибов *Fusarium* недостаточно разработаны. В частности, не выяснено, как влияют состав питательных сред и концентрация гормонов на каллусообразование; какие условия необходимы для максимального эмбриогенеза различных генотипов; как влияют гормоны и их концентрация в каллусогенных и эмбриогенных средах на активность эмбриогенеза; каковы оптимальные условия получения клеточной суспензии и эмбриогенеза в жидких средах; каковы условия получения наиболее токсичных культуральных фильтратов (КФ) грибов; в каком диапазоне концентраций КФ грибов на культуре каллусов можно провести несколько этапов отбора устойчивых клеток без утраты их способности к регенерации; каким образом можно оценить полученные растения-регенеранты на устойчивость к фузариозу. Решению этих вопросов посвящена наша работа.

### Методика

Исследования проведены в лаборатории биотехнологии НПО «Нива Ставрополя» в 1988-1993 гг. Исходным материалом служили 13 сортов и форм люцерны (*Medicago*) трех видов — посевной, серповидной и изменчивой. Эксплантатами для получения каллусов служили

листья, иногда бутоны и ткани проростков. Растительный материал стерилизовали 20 мин в 10% хлорной извести. В качестве питательных сред использовали в основном МБ5 [4] и китайскую среду № 6. Каллусы получали и выращивали в темноте, иногда на рассеянном свете. Для выделения грибов использовали корни люцерны разных возрастов. Работа с грибами проводилась по общепринятым методикам. Культуральную жидкость получали, выращивая изоляты в колбах на 250 мл в 100 мл жидкой среды Чапека-Докса на качалках при 100 об/мин и температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . В каждую колбу вносили по 5 мл суспензии спор  $5 \cdot 10^5$  спор/мл. После 10 сут выращивания проводили фильтрацию через бумажный фильтр, а затем через микрофильтры (0,2 мкм) для отделения спор. Токсичность культуральных фильтратов определяли на проростках люцерны на основе методики О.А. Берестецкого [1].

### Результаты

Способность к регенерации изучали на 11 сортах и сортообразцах. У 5 из них (Славянской местной, Донской, Северной гибридной 69, сортообразцов К-2, 38С) получено по 1 регенеранту; у сортообразца 675/19 — 2 регенеранта. Наибольшей регенерационной способностью обладал сорт Марусинская 425, у которого выделено 5 растений-регенерантов. У 4 сортообразцов (Майкопская 11, Кубанская желтая, Кевсала, К-1) не получено ни одного регенеранта.

Оценка роста каллусов, как уже говорилось выше, чаще всего проводится на основе результатов их взвешивания. Однако при большом

объеме наблюдений такой метод определения из-за высокой трудоемкости весьма усложняет селекционный процесс. Поэтому уже в процессе экспериментальной работы мы пришли к заключению, что для этой цели можно ограничиться визуальной оценкой по 6-балльной шкале: 0 — каллус не растет, 1 — каллус неразвитый, 2 — слаборазвитый, 3 — среднее развитие каллуса, 4 — хорошее развитие, 5 — максимальное развитие каллуса. При оценке учитывали скорость роста, цвет и структуру каллуса. По результатам учетов была определена высокая корреляционная связь между массой каллуса и их визуальной оценкой по 6-балльной шкале —  $r=0,76+0,87$  (табл. 1).

В табл. 2 представлены данные опыта, где эксплантатами служили листья растений-регенерантов 6 сортов, а также растений сортов Славянская местная и Марусинская 425, отличающихся повышенной азотфиксирующей способностью. Из этой таблицы следует, что при пониженных концентрациях гормонов рост каллусов различных образцов был примерно одинаковым и более интенсивным, чем при повышенной концентрации 2,4-Д и кинетина. В последнем случае различия в каллусогенезе были более контрастными.

Дальнейшие опыты с культурой каллусов показали, что интенсивный их рост не является определяющим фактором для регенерации: почки и эмбриоиды часто появляются из медленно растущих каллусов. Для получения морфогенной каллусалучшей оказалась питательная среда МБ5 с концентрацией 2,4-Д и кинетина по 0,2—8 мг/л.

В качестве эмбриогенных сред

**Корреляционная зависимость между массой каллуса люцерны и визуальной оценкой его развития по 6-балльной шкале**

Гормон и его концентрация, мг/л	Славянская местная		Донская 2	
	масса каллуса, мг			
	сырая	сухая	сырая	сухая
2,4-Д+кинетин:				
0,5 +0,5	724±20	36,4±0,9	585±13	33,2±0,5
4,0 + 4,0	413±14	26,0±0,8	396±11	21,0±0,4
В среднем	595	32,1	474	27,9
Средний балл	3,31	3,31	3,01	3,01
Коэффициент корреляции	0,87	0,76	0,85	0,80

Таблица 2

**Средний балл роста каллуса у растений-регенерантов люцерны при различных концентрациях гормонов в питательной среде**

Исходный сорт, форма	2,4-Д+кинетин, мг/л				
	0,2+0,2	2,0+2,0	4,0+4,0	8,0+8,0	$\bar{x}$
Растения-регенеранты:					
Славянская местная	4,7±0,2	3,2±0,5	2,2±0,7	2,2±0,5	3,1
Донская 2	4,5±0,5	3,2±0,2	2,5±0,3	2,5±0,3	3,2
675/19	4,0±0,4	2,2±0,5	1,2±0,5	1,3±0,3	2,2
Марусинская 425	3,0±0,4	2,0±1,1	1,7±0,8	2,0±0,6	2,2
Дединовская	3,7±0,2	1,7±0,5	1,5±0,3	1,2±0,5	2,0
Ремблер	4,7±0,2	2,5±0,9	2,6±0,3	2,7±0,2	3,0
Сорта:					
Славянская местная	4,2±0,2	4,0±0,0	4,0±0,0	3,7±0,2	4,0
Марусинская 425	4,7±0,2	4,0±0,4	3,2±0,2	2,5±0,5	3,6
$\bar{x}$	4,2	2,8	2,4	2,3	2,9
НСР <sub>05</sub> 0,47					

использовали МБ5 и китайскую среду № 6 с бензиламинопурином или кинетином в различных концентрациях. Для регенерации из каллусов и клеточной суспензии наилучшей была питательная среда № 6 с ИУК и кинетином по 0,2 мг/л.

Выявлены особенности регенерации у различных генотипов люцерны. Так, у регенеранта 3-8С эмбриогенез наблюдался только в вариан-

те с высокими концентрациями гормонов (2,4-Д и кинетин по 4—8 мг/л) в каллусогенных средах независимо от вида регенерационной среды (табл. 3).

У регенерантов № 193 (из Донской 2) и № 479 (из Дединовской) такой закономерности не наблюдалось и эмбриониды образовывались и при низких концентрациях гормонов 2,4-Ди кинетина (по 0,2—1 мг/л) в каллусогенной среде.

Т а б л и ц а 3

**Эмбриогенез регенеранта 3-8С  
(шт/каллус) при различных  
концентрациях гормонов в  
каллусогенной среде МБ5**

Регенерационная среда, кинетин+ ИУК, мг/л	Каллусогенная среда+(2,4-Д+ кинетин, мг/л)		
	0,5+0,5	4+4	8+8
МС полная без гормонов	0	15	2
МС+(0,3+0,3)	0	2	22
№ 6+(0,3+0,3)	0	5	1-7
МБ5 без NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + (0,3+0,3)	0	0-8	-

Наибольший выход эмбриондов (50 и более штук на каллус в пробирке) дали регенеранты № 193 и 3—8С (из сортообразца 3-8С), у других номеров он был значительно ниже.

Еще одним определяющим фактором образования эмбриондов является время нахождения каллуса на питательных средах. Обычно наиболее интенсивная регенерация отмечалась через 3 мес после высадки эксплантата, хотя первые эмбриониды появлялись гораздо раньше.

Вероятно, в клеточной массе со временем накапливается фактор, который способствует регенерации. Каллусы № 3-8С находились в каллусогенной среде с низкими концентрациями гормонов (2,4-Д и кинетин, по 1 мг/л) в течение года. Уже через 8 мес в темноте появились нормальные эмбриониды, которые при переносе на свет зеленели.

Клеточную суспензию получали на жидких средах МБ5 и № 6 (те же гормоны по 0,5 мл), при этом ее плотность достигала 500 тыс. клеток на 1 мл. Регенерация в жидких средах начиналась в среднем на 8-е сутки (табл. 4). Быстрое нарастание регенерантов происходило после накопления определенного количества эмбриондов (7—8 шт. на 25 мл среды).

Из всех идентифицированных родов грибов, выделяемых с поверхности и из корней люцерны, более 50% приходилось на *Fusarium*, из которых 50% составляли *F. oxysporum*, 37% — *F. solany*, 10% — *F. gibbosum* и 3% — *F. avenaceum*. Достаточно часто встречались грибы *Penicillium* (17%), *Plenodomus* (10%), *Verticillium* (4%). Для выделения грибов материал стерилизо-

Т а б л и ц а 4

**Динамика образования эмбриондов (шт/колбу) на жидкой  
питательной среде № 6**

Повторность	Период от пассажа, сут				
	8	9	11	13	21
1	7	14	25	60	Более 1000
2	7	15	30	100	То же
3	8	17	35	125	« »
$\bar{x}$ по 1-3	7,3±0,3	15,0±0,9	30,0±2,9	95±19	« »
4	3	3	3	11	« »
5	0	1	4	20	« »
$\bar{x}$ по 4-5	1,5	2	3,5	15,5	« »
6	0	0	0	0	30

вали 0,5% раствором  $K_2MnO_4$  в течение 20 мин. При такой стерилизации первыми проросли грибы рода *Fusarium*, и только потом постепенно появлялись другие их роды. Массовое спороношение грибов происходило при повышенной влажности и температуре  $25 \pm 2^\circ C$ .

Токсичность культуральных фильтратов грибов определяли на проростках люцерны. Рассчитывали ее по формуле

$$T = 100\% \left( \frac{\sum I_{\text{КФ}}}{\sum I_{\text{К}}} \cdot 100 \right), \quad (1)$$

где  $T$  — токсичность культурального фильтрата (КФ),  $\sum I_{\text{КФ}}$  — сумма длин проростков люцерны на КФ гриба;  $\sum I_{\text{К}}$  — сумма длин проростков на воде (контроль).

Была проведена оценка токсичности различных моноспоровых изолятов грибов, выделяемых из корней разных растений люцерны. Данные табл. 5 показывают, что наибольшей токсичностью отличались изоляты грибов *F. oxysporum* (46—99%), менее токсичными были изоляты *F. solani* (45—98%) и *Verticillium* (34—86%).

На уровне каллусов был определен диапазон селективных концентраций культуральных фильтратов. Через месяц в контроле каллусы всех генотипов люцерны оказались лучше развитыми, чем в остальных вариантах (табл. 6). При концентрации КФ грибов 30 и 40% каллусы большинства образцов люцерны гибли, а концентрации 20 и 25% были предельными. Для работы на селективных средах использовали 3 изолята грибов *Fusarium*. На культуральных фильтратах наиболее токсичного изолята *F. oxysporum* гибель каллусов из растений-регене-

Т а б л и ц а 5

**Токсичность культуральных фильтратов изолятов грибов (%) по формуле (1)**

№ изолята	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>Verticillium</i>	<i>Plenodomus</i>	<i>Penicillium</i>
1	99,2	98,39	86,50	85,26	45,93
2	98,39	96,74	85,75	45,29	13,75
3	97,41	87,66	78,86	-	-
4	97,30	79,08	72,29	-	-
5	96,55	72,61	69,25	-	-
6	95,58	71,62	66,25	-	-
7	93,78	68,12	65,76	-	-
8	82,34	62,73	54,30	-	-
9	46,90	54,48	49,90	-	-
10		44,76	34,75	-	-

рантов обычно наступала при концентрации КФ более 10%.

Каллусы различных генотипов люцерны существенно различались по устойчивости к КФ грибов *Fusarium*. Наибольшей устойчивостью характеризовались каллусы № 193 (из Донской 2), которые продолжали расти даже при концентрациях селективного агента 30 и 40%.

На жидких средах с КФ грибов было проведено до 4 пассажей. Концентрация КФ в селективных средах от 5 до 30%. Каждый раз выжившие клетки осаждали на бумажных фильтрах и пассировали (на каллусогенез и регенерацию), на ту же или большую концентрацию КФ грибов, если клеточные суспензии продолжали хорошо развиваться. Такая схема селекционного отбора позволяет не терять регенерационной способности и в то же время выдержать клеточные суспензии на максимально возможной концентрации КФ грибов.

После проведенных отборов получено 11 растений-регенерантов № 193 из Донской 2. Их пересаживали

Рост каллусов (балл) в зависимости от концентрации культуральных фильтратов *Fusarium*

Растение-регенерант	Концентрация фильтратов гриба, %								$\bar{x}$
	0	5	10	15	20	25	30	40	
Донская 2	5,0	5,0	5,0	5,0	4,4 ±0,2	4,4	4,0	3,6 ±0,2	4,5
Северная гибридная 69	5,0	4,4 ±0,2	4,8 ±0,3	4,8	3,0 ±0,2	1,2 ±0,2	1,2 ±0,2	0	3,0
3-8С	5,0	5,0	4,8 ±0,3	4,6 ±0,3	3,2 ±0,3	2,2 ±0,2	0	0	3,1
Марусинская 5425:									
№ 273	5,0	4,2 ±0,2	3,4 ±0,2	2,0 ±0,1	2,2 ±0,2	1,2 ±0,2	0	0	2,2
№ 4	5,0	4,8 ±0,3	5,0 ±0,3	4,8 ±0,3	1,0	1,0	0	0	2,7
Славянская местная	5,0	4,2 ±0,2	4,6 ±0,3	2,2 ±0,2	1,9 ±0,2	1,0	0	0	2,3
675/19	5,0	4,6 ±0,3	3,8 ±0,2	3,6 ±0,2	0	0	0	0	2,1
$\bar{x}$ НСР <sub>05</sub> 0,4	5,0	4,6	4,5	3,8	2,2	1,5	0,9	0,5	2,9

вали на искусственных питательных средах в течение 2,5 лет, а также периодически высаживали в почву в вегетационных и полевых условиях. Разброс признаков у различных генотипов довольно широк. Регенерант № 496 из Славянской местной отличается высокой корнеобразующей способностью; № 291 из Северной гибридной 69 — карлик с мелкими листьями, корни в воде образуются с трудом, но активно растут после обработки ИУК; № 273 из Марусинской 425 имеет характерные большие резные прилистники. У данного регенеранта, а также у № 4 из того же сорта желтогибридной люцерны цветки желтые; № 152 из сортообразца 675/19 имеет высокие прямостоячие негнувшиеся стебли; у № 3-8С из сортообразца 3-

8С — особенно сочные светло-зеленые стебли и листья; у № 193 из Донской 2 — узкие ланцетовидные плотные темно-зеленые листья, вероятно, с повышенным содержанием эндогенных гормонов. К-2 из сортообразца К-2 получен следующим образом: клеточная суспензия бурого цвета, явно нежизнеспособная, была пассирована на агаровую эмбрионную среду. Среди сплывшей погубшей массы клеток появился один регенерант с древесным стеблем. Он медленно рос и не образовал корней. Последние 2 номера находились без пересадки на одной питательной среде в пробирках более года и при этом сохраняли зеленую окраску, не погибали, но практически не росли. После пересадки на свежие среды их рост возобновился.

В вегетационных опытах была проведена предварительная оценка полученных растений-регенерантов на устойчивость к фузариозу. Инфекционный фон создавался путем перемешивания 1 части почвы с 2 частями инфицированного овса. Черенки люцерны укореняли в воде. Через 2 мес развитые укорененные растения высаживали на жесткий инфекционный фон. Погибли все растения сортов Славянская местная, Донская 2 и некоторые из номеров регенерантов. Устойчивыми к фузариозу оказались растения из № 3-8С, (выжило 10 из 28), № 459 из сорта Ремблер (9 из 23), № 496 из Славянской местной (6 из 32), № 193 из Донской 2 (5 из 20). Из 34 растений № 193/1, полученных после селективных сред с КФ грибов, выжило 13 растений. Регенеранты переданы в селекционный процесс.

Проведенные нами исследования позволили разработать схему отбора устойчивых к фузариозу форм люцерны с использованием методов культуры каллусов и клеток. Она включает 4 этапа.

*Задача I этапа* — отобрать генотипы люцерны с высоким регенерационным потенциалом, для каждого растения-регенеранта подобрать индивидуальные концентрации гормонов, обеспечивающие максимальный морфогенез. На этом этапе выполняются следующие работы:

- получение морфогенного каллуса на каллусогенной среде МБ5 с более низкой (0,2—1 мг/л) и более высокой (4—8 мг/л) концентрациями гормонов 2,4-Д и кинетика;

- получение растений-регенерантов на китайской среде № 6+кинетин и ИУК, по 0,2 мг/л;

- получение клеточной суспен-

- зии из морфогенного каллуса на питательных средах МБ5 или № 6+2,4-Д и кинетин, по 0,5 мг/л;

- получение почек и эмбриоидов в жидких средах на китайской среде № 6+кинетин и ИУК, по 0,2 мг/л;

- в качестве сред для высадки эмбриондов и черенков люцерны следует использовать МБ5 или МС без гормонов из расчета 1/2 состава.

*Задача II этапа* — получить наиболее токсичные культуральные фильтраты грибов *Fusarium*:

- выделение грибов из корней люцерны на подкисленный картофельный агар;

- получение чистых культур грибов на картофельной среде и среде Чапека;

- идентификация грибов на среде Чапека;

- получение культуральной жидкости грибов на среде Чапека — Докса;

- получение культурального фильтрата (КФ), фильтры 0,2 мкм;

- оценка токсичности КФ различных изолятов грибов на проростках люцерны;

- отбор наиболее токсичных КФ.

*Задача III этапа* — отобрать клетки люцерны, устойчивые к КФ грибов, и получить растения-регенеранты:

- пассаж каллусов на селективных средах с наиболее токсичными КФ грибов;

- оценка и отбор устойчивых каллусов. Определение диапазона селективных концентраций грибов для отбора клеток люцерны, устойчивых к патогену;

- пассаж клеточных суспензий с высоким морфогенным потенциалом на селективные среды с определенным диапазоном концентраций КФ грибов по схеме:

1-й пассаж	2-й и последующие
Концентрация КФ грибов, %	на каллусогенез и регенерацию
	0
	10
	20
	25
	30

**Задача IV этапа** — изучить растения-регенеранты в лабораторных, вегетационных и полевых условиях.

Полученные на I и III этапах регенеранты высаживают в вегетационные сосуды на жестком инфекционном фоне фузариоза, отбирают устойчивые растения. Отобранные растения высаживают в поле, включая их в селекционный процесс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Берестецкий О.А.* Определение фитотоксической активности культур микроскопических грибов. — В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев, 1973, с. 165-175. — 2. *Игнатова С.А., Овсяк Т.Н., Лукьянюк С.Ф., Сечняк Л.К.* Использование культуры тканей люцерны для создания форм, устойчивых к фузариозу. — Тез. докл. Междунар. конфер. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988, т. 1, с. 175-176. — 3. *Кучеренко Л.А., Маддумге Р.П., Гужев Ю.Л.* К методике определения массы каллусных тканей в процессе культивирования. — С.-х. биол. Сер. биол. раст., 1991, № 3, с. 84-85. — 4. *Мезенцев А.В.* Методические указания по регенерации и размножению люцерны с использованием культуры тканей, клеток и протопластов. М.: Изд-во ВАСХ-

НИЛ, 1980. — 5. *Мезенцева О.Ю.* Создание исходного селекционного материала люцерны и пшеницы, устойчивого к фузариозу, методом клеточной селекции. — Автореф. канд. дис. М., 1992. — 6. *Плащев В.М., Гусева Н.Н.* Клеточная селекция устойчивых форм. — Защита растений, 1986, № 8, с. 28-29. — 7. *Arcioni S., Pezzotti M., Damiani F.* — Theoret. a. Applied Genet., 1987, vol. 74, N 6, p. 700-705. — 8. *Churova K., Holickova L.* Skusenestis pripravou a pestovanim kalusovej kultury Medicago sativa L. in vitro. — Veb Prace/Vysk. Ustav. Kastl. Vyrohy v Piestanoch, 1979, vol. 16, p. 5-7. — 9. *Fowler C.W., Jules Janick.* — Hortscience, 1974, vol. 9, N 6, p. 552. — 10. *Hartman C.L. McCoy J.V., Knous J.R.* — Plant Sci. Lett., 1984, vol. 34, N 1, 2, p. 183-194. — 11. *Michael P. Hooker, Murray W. Nahors.* — Pflanzenphysiol., 1977, Bd 84, N 3, S. 237-246. — 12. *Novak F.J., Konecna D.* — Z. Pflanzenphysiol., 1982, Bd 105, N 3, S. 239-284. — 13. *Saunders J.W., Bingham E.J.* — Crop Sci., 1972, vol. 12, N 6, p. 804-808. — 14. *Skokut J.A. Manchester J., Schaefer J.* — Plant Physiol., 1985, vol. 79, N 3, p. 579-583. — 15. *Walker K. et al.* Plant Sci. Lett., 1979, vol. 16, p. 23-30.

Статья поступила 24 марта  
1994 г.

## SUMMARY

A procedure for producing alfalfa forms resistant to fusariosis using callus culture and cells has been developed. It consists of 4 main stages.

Regenerate plants are obtained from alfalfa varieties Slavyanskaja local, Donskaja 2, Severnaja hybrid 69, Marusinskaja 425, from varietal samples K-2, 3-8C, 675/19. As to their regenerative ability, the genotypes studied are divided into 2 groups: morphogenous calluses are formed with low concentrations of hormones 2.4-D and kinetin (0.2-0.5 mg/l each) and with high concentrations of these hormones (4—8 mg/l each). The most morphogenous callus is formed on the medium MB5+(2.4-D and kinetin, 2—8 mg/l each). As regeneration medium, the medium N6+(2.4-D and kinetin, 0.2 mg/l each) is used. Formation of embryoids in liquid media is more intensive after certain amount of them was accumulated.