

УДК 581.143.6 (581.151)

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ КАЛЛУСА У ТИМОФЕЕВКИ ЛУГОВОЙ
НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ

А. В. Заушинцева, В. Ю. Березин

EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF CALLUS FORMATION IN TIMOTHY
ON SELECTIVE MEDIA

A. V. Zaushintsena, V. Yu. Berezin

Тимофеевка луговая сорта Мечта была введена в культуру *in vitro* для получения каллуса, устойчивого к загрязнению отработкой минерального масла. Отобранные образцы каллуса, пригодные для последующей работы по регенерации растений тимофеевки луговой. Для этого на селективной среде культивировались экспланты зрелых зародышей. Частота каллусообразования составила 24,4 %. С увеличением концентрации загрязнителя в питательной среде линейные параметры каллусной массы снижаются: потеря в нарастании массы составляет от 29,75 до 58,0 мг. Отработанное минеральное масло в концентрации 1 % не является летальным вариантом для каллуса, выделенного из зрелых зародышей тимофеевки луговой.

Common timothy of *Mechta* cultivar was put into *in vitro* culture for producing the callus resistant to contamination with engine oil. For this purpose, explants of mature embryos were cultured on selective medium. The frequency of callus formation was 24,4 %. The selected samples of callus are suitable for further work on the regeneration of transformed plants of timothy grass.

Ключевые слова: культура *in vitro*, тимофеевка луговая, зрелый зародыш, эксплант, нефтепродукты, моторное масло, устойчивость.

Keywords: *in vitro* culture, common timothy, mature embryo, explants, petroleum, engine oil, resistance.

Тимофеевка луговая (*Phleum pratense* L.) является ценным верховым рыхлокустовым злаком, который наиболее распространен на лугах лесной и лесостепной зоны Северного Кавказа и Восточной и Западной Европы, а также частично Средней Азии, Сибири и Дальнего Востока [5]. Это кормовое растение отличается хорошей облиственностью (более 50 % от общей массы) и обладает высокой питательностью, так как содержит около 12 % протеина, 50 кормовых единиц в сене. Такой корм отлично поедается животными. Данный вид используют в полидоминантных злаково-разнотравных сообществах для формирования хорошего по всем критериям травостоя. Кроме того, тимофеевку активно используют в рекультивации для закрепления эродированных почв [1].

Среди многолетних злаковых трав, используемых для фиторекультивации нефтезагрязненных земель, выделяется тимофеевка луговая, обладающая устойчивостью к нефти и приспособленностью к широкому диапазону почвенно-климатических условий [3]. Наряду с этим не все существующие сорта одинаково устойчивы к загрязнению почвы нефтью и нефтепродуктами. Поэтому получение форм тимофеевки луговой, устойчивых к загрязнению нефтепродуктами, является важной задачей селекции, а реализация программы возможна методами биотехнологии в культуре *in vitro*.

Использование клеточной селекции для создания новых форм и сортов основано на высокой генетической изменчивости клеток *in vitro* и тотипотентности растительных клеток [2; 7].

Разработка и корректировка селективных сред с использованием углеводородных загрязнителей в культуре *in vitro* позволяет регулировать воздействие

стрессового фактора на отдельные клетки и ткани, а затем выделять из каллусной ткани растения-регенеранты наиболее адаптированные к данному виду физиологического стресса.

В научной литературе имеются сведения о том, что приобретенные на селективных средах в культуре *in vitro* признаки и свойства наследуются в потомстве растений-регенерантов [8].

Цель исследований: выделение каллусов, устойчивых к загрязнению отработанным минеральным маслом, из зрелых зародышей тимофеевки луговой на селективных средах.

Материалы и методы исследований

В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши тимофеевки луговой сорта Мечта. Стерилизацию семян проводили 70 %-ным этиловым спиртом в течении 1 мин с последующим двухразовым промыванием стерильной дистиллированной водой. Затем семена замачивали для набухания в стерильной воде на 24 ч, далее зрелые зародыши выделяли с помощью пинцета и скальпеля с модернизированным лезвием. Зародыши повторно стерилизовали 70 %-ным этиловым спиртом в течении 15 сек. с последующим четырехразовым промыванием стерильной инъекционной водой. Для образования каллуса зародыши помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга (контроль) и на селективные среды (опыт) с содержанием загрязнителя в концентрациях 0,01 %, 0,05 % и 0,1 % отработанного минерального масла на 1 литр среды. Для снижения стрессового фактора в опытные среды добавляли стимулятор роста Аргон в концентрации 1 и 5 % на литр. Экспланты культивировали на рассеянном свете при температуре 22 – 24 °С. Частота обра-

зования каллуса рассчитывалась как отношение эксплантов, образовавших каллус, к общему числу высаженных на питательную среду. Результат исследования выражен в процентах (%).

Результаты исследований и обсуждение

Каллус образовывался на раневой поверхности тканей зародыша на 5 – 7 сутки после посадки эксплантов. Он представляет собой белые либо прозрачные скопления каллусных клеток. На 10 – 12 сутки цвет каллуса изменялся от бледно-розовой до насы-

шенно розовой окраски. Полученные результаты согласуются с исследованиями других ученых по получению каллусов путем извлечения зрелых зародышей ярового ячменя [6].

В наших опытах на эксплантах тимофеевки луговой выделено три типа каллуса: I тип – красный (розовый), плотный; II тип – белый, плотный; III тип – бесцветный (прозрачный), водянистый. Количество и распределение полученного каллуса представлено в таблице 1.

Таблица 1

Образование каллуса тимофеевки луговой на селективных питательных средах

Вариант питательной среды	Количество высаженных эксплантов, шт.	Количество образовавшегося каллуса, шт.	Тип каллуса		
			красный	белый	прозрачный
Контроль	12	0	0	0	0
Контроль	12	0	0	0	0
Контроль	12	6	6	0	0
Контроль	18	0	0	0	0
0,01 %	12	0	0	0	0
0,01 %	12	0	0	0	0
0,01 %	12	12	8	4	0
0,01 %	18	0	0	0	0
0,05 %	12	6	3	3	0
0,05 %	12	6	0	0	6
0,05 %	12	12	9	3	0
0,05 %	18	0	0	0	0
0,1 %	12	0	0	0	0
0,1 %	12	0	0	0	0
0,1 %	12	6	4	2	0
0,1 %	18	0	0	0	0
0,01+1 %	12	12	7	5	0
0,01+1 %	12	6	0	0	6
0,01+1 %	12	0	0	0	0
0,01+1 %	18	0	0	0	0
0,05+1 %	12	0	0	0	0
0,05+1 %	12	0	0	0	0
0,05+1 %	12	12	7	5	0
0,05+1 %	18	0	0	0	0
0,1+1 %	12	0	0	0	0
0,1+1 %	12	0	0	0	0
0,1+1 %	12	12	9	3	0
0,1+1 %	18	0	0	0	0
0,01+5 %	12	6	6	0	0
0,01+5 %	12	6	0	0	6
0,01+5 %	12	6	4	2	0
0,01+5 %	18	0	0	0	0
0,05+5 %	12	6	6	0	0
0,05+5 %	12	0	0	0	0
0,05+5 %	12	6	6	0	0
0,05+5 %	18	0	0	0	0
0,1+5 %	12	0	0	0	0
0,1+5 %	12	0	0	0	0
0,1+5 %	12	12	11	1	0
0,1+5 %	18	0	0	0	0
Итого	540	132	86	28	18
Частота образования каллуса, %	-	24,4	15,9	5,2	3,3

Частота образования всех видов каллуса составила 24,4 % от высаженного количества эксплантов. Расчетное распределение по типам образовавшегося каллуса составило 65,15 % красного (розового), 21,22 % белого, 13,63 % бесцветного. В ходе дальнейшего культивирования каллус прозрачного типа погибал на 25 – 30 сутки после высадки эксплантов.

Для подтверждения устойчивости каллусных клеток к негативному воздействию загрязнителя в питательной среде увеличили концентрацию загрязнителя в селективной среде в 10 раз (до 0,1; 0,5 и 1,0 % загрязнителя на литр питательной среды). Основанием к этому явились известные в научной литературе приё-

мы двухступенчатой селекции *in vitro* на повышение солеустойчивости растений путем увеличения силы влияния селективного фактора [4].

Под воздействием загрязнителя на фоне концентрации более 0,5 % часть красного (розового) каллуса обесцвечивалась, переходя в белый тип. Каллус белого цвета на увеличение концентрации стрессового фактора реагировал значительно сильнее красного (розового). Это выражено в торможении процессов формирования общей массы и увеличения объема каллуса.

На 14-е сутки измерены морфометрические показатели каллусной массы (таблица 2).

Таблица 2

Морфометрические показатели и масса каллуса I типа

Концентрация загрязнителя в культуре <i>in vitro</i>	Длина, мм	Ширина, мм	Высота, мм	Масса каллуса, мг
Контроль	13,25 ± 1,36	9,00 ± 1,05	2,75 ± 0,58	81,25 ± 12,35
0,1 %	8,37 ± 1,11	7,50 ± 1,11	2,75 ± 0,58	55,00 ± 10,41
0,5 %	9,50 ± 1,21	6,50 ± 1,05	1,87 ± 0,31	27,75 ± 3,57
1 %	8,37 ± 1,11	6,13 ± 1,05	1,50 ± 0,31	23,25 ± 3,60
HCP ₀₅	2,89 ± 0,58	2,21 ± 0,51	0,66 ± 0,09	7,76 ± 1,11

При внесении в среду отработанного минерального масла в концентрации 0,1 % уменьшаются линейные параметры каллуса (ширина и длина) на 1,5 – 4,8 мм. Масса снизилась в среднем на 37 %.

С увеличением концентрации загрязнителя в питательной среде до 0,5 % масса каллусных клеток снизилась в три раза по отношению к контрольному варианту. Ширина и высота каллуса уменьшились более чем на 30 %. Увеличение длины связано с изменением плотности сложения на более рыхлое, до почти водянистого.

При дальнейшем увеличении концентрации загрязнителя в питательной среде в 2 раза (до 1 %) линейные параметры изменяются незначительно. В сравнении с контрольным вариантом масса каллуса

уменьшилась на 58 мг, длинна – на 4,8 мм, ширина на 2,8 мм, а высота каллусной массы снизилась на 45 %.

Выводы

1. Частота образования каллуса в среднем по опыту составила 24,4 %.

2. С увеличением концентрации загрязнителя в питательной среде линейные параметры каллусной массы снижаются, потеря в нарастании массы составляет от 29,75 до 58,0 мг.

3. Отработанное минеральное масло в концентрации 1 % не является летальным вариантом для каллуса, выделенного из зрелых зародышей тимфефевки луговой.

Литература

1. Андреев Н. Г. Луговое и полевое кормопроизводство: учебник для вузов по агр. спец. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1989. 495 с.
2. Бутенко Р. Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 42 – 54.
3. Инженерно-экологические изыскания территории нефтяных и газовых месторождений, инвентаризация и рекультивация нефтезагрязненных земель // Экологическое сопровождение нефтегазовых месторождений: аналитический обзор / отв. ред. А. Г. Гендрин. Новосибирск, 2005. С. 92 – 95.
4. Ларина С. Н. Клеточные линии и растения-регенеранты как модель для изучения солеустойчивости: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1995. 24 с.
5. Медведев П. Ф., Сметанникова А. И. Кормовые растения европейской части СССР: справочник. Л.: Колос, 1981. С. 103 – 281.
6. Танасиенко И. В., Емец А. И., Блюм Я. Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории Украины // Цитология и генетика. 2009. № 4. С. 12 – 19.
7. Шамина З. Б. Особенности генетической изменчивости соматических клеток растений // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 3. С. 361 – 364.
8. Широких И. Г., Огородникова С. Ю. Влияние ионов водорода и алюминия на пигментный комплекс, перекисное окисление липидов и проницаемость клеточных мембран растений ячменя, полученных на селективных системах *in vitro* // Агрохимия. 2013. № 2. С. 90 – 96.

Информация об авторах:

Заушинцева Александра Васильевна – доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники КемГУ, 8-923-606-38-85, alexaz58@yandex.ru.

Alexandra V. Zaushintseva – Doctor of Biology, Professor at the Department of Botany, Kemerovo State University.

Березин Виктор Юрьевич – аспирант кафедры ботаники КемГУ, специалист отдела экологии ООО «Сидиус», bere.vik@mail.ru.

Viktor Yu. Berezin – post-graduate student at the Department of Botany, Kemerovo State University; specialist at the Ecology Division, ООО «Sidius».

(Научный руководитель – *А. В. Заушинцева*).

Статья поступила в редколлегию 17.12.2014 г.