

УДК 581.143.6:582.736

РЕГЕНЕРАЦИЯ И МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

В.Н. РЕШЕТНИКОВ, Т.И. ФОМЕНКО, Л.Г. БЕРДИЧЕВЕЦ, М.К. МАЛЮШ
ГНУ "Центральный ботанический сад НАН Беларуси"

Приведены результаты исследований по морфогенному потенциалу различных эксплантов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Показано преимущество использования семядольных узлов в качестве эксплантов для получения активного морфогенеза в культуре *in vitro*. Для сортов Витебчанин, Кармин, Мутант 23, Вјursele разработан метод регенерации растений и микроклонального размножения. Наибольшей морфогенной активностью из всех рассмотренных сортов клевера лугового обладает сорт Витебчанин.

Ключевые слова: клевер луговой, растительная регенерация, микроклональное размножение, культура *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) — широко культивируемый вид клевера, имеющий важное значение в создании кормовой базы. Для селекции этой культуры наряду с традиционными методами применяются современные биотехнологии, предполагающие разработку методов регенерации, а также микроклонального размножения в культуре *in vitro*. Процесс регенерация у бобовых достаточно сложен, поэтому подбор типа экспланта, гормонального состава сред культивирования и условий культивирования необходимо тщательно отрабатывать. В литературных источниках приводятся данные по регенерации клевера из эксплантов гипокотелей, каллусных культур, суспензионных культур, протопластов [1, 2]. В ряде работ представлены результаты по оптимизации метода микроклонального размножения [3–5]. Признанным является факт наличия видовой и сортовой специфичности каллусо- и морфогенеза у бобовых. Подобная особенность отмечена и для клевера [6, 7]. Поэтому разработку методов культуры *in vitro* необходимо проводить с учетом сортовых отличий этой культуры. Целью наших исследований являлась разработка методов микроклонального размножения и оценка морфогенного потенциала

различных сортов клевера в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

При введении в культуру *in vitro* клевера лугового сортов Витебчанин, Кармин, Мутант 23, Bjursele использовали семена, которые стерилизовали и проращивали в асептических условиях. Стерилизацию проводили последовательной обработкой семян 0,01% раствором перманганата калия (3 мин) и 0,1% раствором диоксида (8 мин) с последующей пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Такая обработка семян обеспечивала стерильность с сохранением высокой всхожести. После стерилизации семена помещали на среду МС и проращивали при 24 °С, освещенности 3000 лк и 16-часовом фотопериоде. Для микроклонального размножения клевера лугового использовали среду В5 [8], содержащую 4 мг/л БАП. Полученные пазушные побеги отделяли от первичного материнского экспланта и культивировали на аналогичной питательной среде. Оценку развития морфогенных процессов проводили на гипокотылях, семядолях и междолевых узлах 6–7-дневных проростков. Экспланты тканей культивировали на среде В5 с различным сочетанием гормонов.

Результаты и обсуждение

При микроклональном размножении клевера лугового был использован метод активации пазушных меристем, который основан на снятии апикального доминирования введением в среду культивирования цитокининов, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов [9]. Проведен подбор сред для оптимизации

роста растений клевера лугового в культуре *in vitro*. С этой целью растения клевера, введенные в культуру через семена, культивировали на средах, отличающиеся по минеральному составу — В5, МС и S МС. Активный рост отмечен на среде В5, на которой в дальнейшем проводили микроклональное размножение растений. Показано, что добавление ауксинов (0,1 мг/л α -НУК) стимулировало образование более развитой корневой системы. При микроразмножении растений одним из центральных вопросов является концентрация вносимых в питательную среду фитогормонов. Поскольку клевер является перекрестно опыляемой культурой показано, что каждому индивидуальному генотипу клевера лугового соответствует концентрация БАП (в пределах от 1 до 20 мг/л), при которой осуществляется активная пролиферация пазушных меристем [10]. На основе этого явления разработан способ ускоренного микроклонального размножения *in vitro* индивидуальных генотипов клевера лугового, основанный на эффекте прямой регенерации (или прямого морфогенеза) из соматических клеточных эксплантов [11]. Однако, использование высоких концентраций цитокининов с целью получения максимального коэффициента размножения вызывает такие нежелательные для микроклонального размножения эффекты, как изменение морфологии растений, подавление пролиферации пазушных меристем, уменьшение способности побегов к укоренению. Питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающие достаточную скорость микроразмножения, а также чередование циклов культивирования на средах с низким и высоким

уровнем фитогормонов, помогают добиться оптимального развития микроклонов.

В наших исследованиях для микроклонального размножения клевера лугового использованы среды, содержащие от 2 до 10 мг/л БАП. Отмечено, что при культивировании на всех рассмотренных вариантах сред наблюдалась активная пролиферация пазушных меристем и образование пазушных побегов. Побеги, отделенные от первичного экспланта, культивировали на аналогичной питательной среде. Показано, что оптимальной концентрацией БАП в среде культивирования является 4 мг/л, и в дальнейшем для микроклонального размножения клевера лугового использовали среду, содержащую 4 мг/л БАП (рис. 1).

Для разработки эффективных методов адвентивной регенерации клевера лугового в культуре *in vitro* в качестве эксплантов были использованы гипокотили, семядоли и семядольные узлы 6–7-дневных проростков. Подбор условий культивирования показал преимущество сред, базовой основой которых являлась среда Гамбурга В5. Индукцию морфогенеза на

эксплантах стимулировали фитогормонами (БАП, кинетин, ИУК и α -НУК) [12].

При культивировании эксплантов, полученных из гипокотилей клевера лугового сорта Витебчанин на средах, содержащих наряду с 0,1 мг/л α -НУК различные концентрации БАП (от 1 до 7 мг/л), наблюдали образование адвентивных побегов на всех средах. Однако, частота регенерации была невысокой и не превышала 14,52%. Количество регенерантов, образовавшихся на одном экспланте, было также сравнительно низким (от 1 до 4 побегов), с наиболее активной регенерацией в среде, содержащей 4 мг/л БАП.

Сравнение морфогенной активности исследуемых сортов показало, что наибольшей морфогенной активностью обладал сорт Витебчанин (таблица 1). Частота регенерации на эксплантах гипокотыля этого сорта была в 1,8 раза выше, чем у сорта Кармин и почти в 3 раза выше, чем у сорта Вjursele и Мутант 23. Добавление в среду культивирования кинетина снижало частоту регенерации. Так для сорта Кармин при добавлении 2 мг/л кинетина частота регенерации была в 3,6 раза



Рисунок 1. Микроклональное размножение клевера лугового на среде В5, содержащей 4 мг/л БАП

Таблица 1. Влияние гормонального состава сред на морфогенную активность гипокотилей различных сортов клевера лугового

Сорт	Частота регенерации, %		
	I	II	III
Витебчанин	14,52	11,90	10,00
Кармин	8,00	7,75	2,25
Мутант 23	5,43	5,00	4,40
Vijrsele	5,75	3,85	0

Примечание: "I" — среда, содержащая 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК; "II" — среда, содержащая 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК, 1 мг/л кинетина; "III" — среда, содержащая 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК, 2 мг/л кинетина.

Таблица 2. Морфогенная реакция эксплантов гипокотилей клевера лугового сорта Витебчанин на средах с различными концентрациями ауксинов

Концентрация гормонов, мг/л			Интенсивность каллусогенеза	Частота регенерации, %	
БАП	α -НУК	ИУК		побеги	корни
2	-	-	+	4,8	-
2	0,1	-	++	5,3	-
2	0,5	-	+++	7,2	6,7
2	-	0,5	++	-	12,5
4	-	-	+	6,0	-
4	0,1	-	++	9,5	-
4	0,5	-	+++	10,7	-
4	-	0,5	++	4,6	7,1

Примечание: "+" — степень выраженности процесса.

ниже, чем у сорта Витебчанин, а у сорта Vijrsele — морфогенная реакция на гипокотилеях отсутствовала.

При культивировании семядольных листьев на всех выше рассмотренных морфогенных средах не наблюдали образования адвентивных побегов. Отмечено образование краевого каллуса и в редких случаях ризогенез.

Для выяснения влияния концентрации α -НУК в среде культивирования на морфогенную реакцию гипокотильных эксплантов клевера были взяты за основу среды, содержащие 2 и 4 мг/л

БАП. Как видно из данных, представленных в таблице 2, увеличение концентрации α -НУК в среде культивирования несколько усиливало морфогенную активность этих эксплантов.

Число образовавшихся адвентивных побегов было в среднем невысоким (1–2 побега на эксплант), но на отдельных эксплантах на среде, содержащей 4 мг/л БАП и 0,5 мг/л α -НУК, число побегов достигало 8 (рис. 2). Показано, что при работе с гипокотилеями большее значение имеет место взятия экспланта. Так, на эксплантах верхней

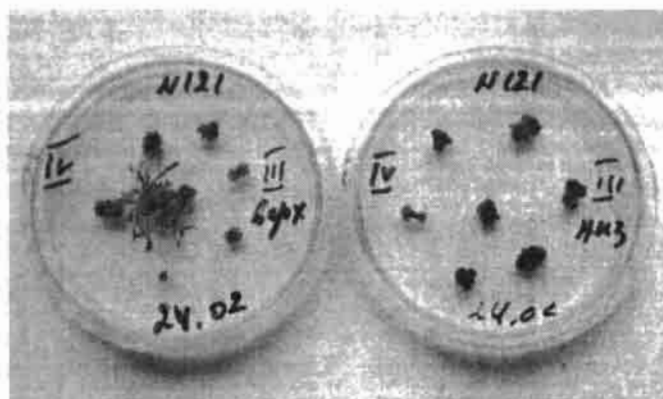


Рисунок 2. Инициация морфогенеза на гипокотильных эксплантах клевера лугового в зависимости от места их вычленения

части гипокотилей наблюдали образование адвентивных побегов, а на эксплантах нижней части гипокотыля морфогенная активность либо отсутствовала, либо выражалась только ризогенезом.

При культивировании гипокотилей на среде, содержащей 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л α -НУК, наряду с образованием адвентивных побегов наблюдали ризогенез. Отмечено, что для всех исследованных вариантов с увеличением в среде культивирования концентрации α -НУК наблюдали более интенсивное образование каллусной ткани. Такое усиление каллусогенеза в свою очередь может повлиять на соматическую вариабельность получаемых регенерантов.

Замена в среде культивирования 0,5 мг/л α -НУК на такую же концентрацию ИУК понижало частоту регенерации адвентивных побегов на гипокотильях на среде, где концентрация БАП была 4 мг/л, до 4,55% с одновременным увеличением ризогенной активности. Снижение концентрации БАП до 2 мг/л проявлялось в отсутствии побегообразования. Отмечено, что во

всех рассмотренных вариантах среда замена α -НУК на ИУК привела к снижению каллусогенеза.

Увеличение в среде культивирования концентрации ауксинов приводило к усилению процессов каллусо- и ризогенеза при отсутствии побегообразования. Как видно из данных, представленных в таблице 3, на гипокотильях сорта Bjursele наблюдали более интенсивное образование каллусной ткани, чем у сорта Витебчанин на средах, содержащих 2, 3 и 4 мг/л α -НУК. На среде, содержащей 2 мг/л α -НУК каллусогенная реакция у обоих сортов была невысокой. Увеличение концентрации α -НУК до 3 мг/л не повлияло на интенсивность каллусогенеза на гипокотильях клевера сорта Витебчанин. Только добавление в среду культивирования 4 и 5 мг/л α -НУК привело к более интенсивному образованию каллусной ткани. При культивировании семядольных листьев этого сорта на среде, содержащей 2 мг/л α -НУК, наблюдали высокую каллусогенную активность, которая сохранялась и на средах с более высокой концентрацией α -НУК (таблица 4).

Таблица 3. Влияние концентрации α -НУК на инициацию каллусо- и ризогенеза на гипокотилеях клевера лугового сортов Витебчанин и Вјursele

α -НУК, мг/л	Интенсивность каллусогенеза		Частота инициации ризогенеза, %		Среднее число корней на эксплант, шт.	
	Вјursele	Витебчанин	Вјursele	Витебчанин	Вјursele	Витебчанин
1	+	+	70,0	100	2,9 \pm 0,8	2,2 \pm 0,5
2	++	+	75,0	100	3,5 \pm 0,9	3,0 \pm 1,4
3	++	+	87,5	100	3,9 \pm 0,8	3,3 \pm 0,9
4	+++	++	57,1	100	3,0 \pm 0,6	4,1 \pm 1,2
5	++	++	72,7	66,7	2,9 \pm 0,7	4,8 \pm 1,9

Примечание: "+" — степень выраженности процесса.

Таблица 4. Влияние α -НУК на инициацию каллусо- и ризогенеза на семядольных листьях клевера лугового сортов Витебчанин и Вјursele

α -НУК, мг/л	Интенсивность каллусогенеза		Частота инициации ризогенеза, %		Среднее число корней на эксплант, шт.	
	Вјursele	Витебчанин	Вјursele	Витебчанин	Вјursele	Витебчанин
1	+	+	75,0	50,0	4,8 \pm 1,5	4,00 \pm 0,58
2	+	++	85,7	66,7	5,7 \pm 1,1	8,75 \pm 2,06
3	++	++	85,7	83,3	7,8 \pm 1,5	9,00 \pm 0,41
4	+++	++	100	100	11,1 \pm 1,4	8,00 \pm 2,27
5	++	++	100	100	8,2 \pm 1,1	10,67 \pm 2,30

Примечание: "+" — степень выраженности процесса.

Самую высокую каллусогенную активность на эксплантах семядольных листьев и гипокотилей наблюдали у сорта Вјursele на среде, содержащей 4 мг/л α -НУК. Наряду с каллусогенной активностью на всех типах эксплантов отмечена инициация ризогенеза. Частота инициации ризогенеза на гипокотилеях клевера сорта Витебчанин почти во всех вариантах составила 100% и только при концентрации α -НУК 5 мг/л — 66,7%. Иную зависимость наблюдали у гипокотилей сорта Вјursele. Процесс ризогенеза колебался от 57,1% при концентрации α -НУК 4 мг/л до 87,5% при 3 мг/л в среде культиви-

рования. Ризогенная активность на семядольных листьях у рассмотренных сортов увеличивалась с ростом концентрации α -НУК в среде культивирования и при концентрации 4 и 5 мг/л α -НУК достигала 100%.

При оценке ризогенной активности эксплантов на средах с различным содержанием α -НУК наряду с оценкой частоты ризогенеза проводили учет количества корней, образовавшихся на каждом экспланте. Отмечено, что на всех средах число образовавшихся корней на эксплантах семядольных листьев, было значительно выше, чем на эксплантах гипокотилей. Показано,

что с увеличением концентрации α -НУК в среде культивирования возрастало число образовавшихся корней на семядольных листьях у всех сортов. На эксплантах гипокотилей эта зависимость не так четко прослеживалась. Отмечено, что на всех типах эксплантов исследуемых сортов клевера на среде, содержащей 1 мг/л α -НУК, образовывалось наименьшее количество корней.

При культивировании эксплантов, выделенных из гипокотилей и семядольных листьев клевера сорта Витебчанин, на средах с различной концентрацией 2,4-Д (1, 2, 3 и 4 мг/л), инициация каллусогенеза наблюдали во всех вариантах. Образовавшаяся каллусная ткань характеризовалась рыхлой консистенцией. Оценка нарастания каллусной массы показала, что наиболее активное каллусообразование на всех типах эксплантов шло на средах, содержащих 1 и 2 мг/л 2,4-Д. При увеличении в среде культивирования концентрации этого ауксина каллусогенная активность падала. Отмечено, что экспланты семядольных листьев обладали большей каллусогенной активностью, чем экспланты

гипокотилей. Наряду с образованием каллуса при культивировании гипокотилей на средах, содержащих 1 и 2 мг/л 2,4-Д, наблюдали инициацию ризогенеза. Частота ризогенеза была невысокой (21,21 и 11,11% соответственно). При пассировании каллусов на морфогенезную среду, содержащую 4 мг/л БАП и 0,1 мг/л α -НУК, отмечен прирост каллусной массы с инициацией ризогенеза без образования адвентивных побегов. Таким образом, морфогенный потенциал семядольных листьев в культуре *in vitro* был ниже гипокотилей.

Использование семядольных узлов в качестве эксплантов для инициации активного морфогенеза показало их значительное преимущество перед другими эксплантами. При культивировании семядольных узлов на средах, содержащих концентрации БАП от 1 до 10 мг/л, наблюдали как прямую регенерацию, так и регенерацию из меристемных очагов каллуса, образовавшегося в основании экспланта (рис. 3, а). Отмечена различная морфогенетическая реакция эксплантов при культивировании на одной среде. Подобные



а



б

Рисунок 3. Инициация морфогенеза на семядольных узлах клевера лугового сорта Вjursele (а), развитие множественных побегов при пассировании на морфогенезную среду (б)

различия в реакции семядольных узлов на цитокинины, наблюдающиеся в пределах каждого генотипа, описывались ранее в работах Л. Г. Близнюк [11, 13].

Для большинства исследуемых генотипов наибольшая морфогенная активность выявлена на среде, содержащей 4 мг/л БАП. Культивирование семядольных узлов на средах, содержащих более высокие концентрации БАП (8 и 10 мг/л), хотя и инициировало активный морфогенез, но образовавшиеся побеги отличались пониженной жизнеспособностью при последующих пересадках.

Наибольшей морфогенной активностью из всех рассмотренных сортов клевера лугового обладал сорт Витебчанин. После 3-х недель культивирования на среде, содержащей 4 мг/л БАП, у 69,2% семядольных узлов этого сорта наблюдалась пролиферация пазушных меристем, в то время как у сорта *Vjursele* только на 36,8%. После второго пассажа, наряду со 100% пролиферацией верхушечной и пазушных меристем, наблюдали высокий выход адвентивных побегов из образовавшейся каллусной ткани. Дальнейшие пассажи семядольных узлов на морфогенных средах приводили к увеличению образования регенерантов, число которых было сложно подсчитать из-за их очень близкого расположения друг от друга (рис. 3, б).

Вывод

Разработан метод активной регенерации побегов в культуре тканей клевера лугового. Показано преимущество использования семядольных узлов в качестве эксплантов. При культивировании семядольных узлов на средах, содержащих различные кон-

центрации БАП (2–10 мг/л), во всех случаях наблюдалась как прямая регенерация, так и регенерация из меристемных очагов каллуса, образовавшегося в основании экспланта. Получена регенерация побегов из ткани гипокотыля, установлено значение место взятия экспланта для активности морфогенной реакции. Показана зависимость эффективности развития микроклонов от уровня экзогенного цитокинина в среде культивирования. Подобрана оптимальная культуральная среда для микроклонального размножения клевера лугового.

Список литературы

1. Куренина Л. В., Солодкая Л. А., Лапотькина Л. И., Мазин В. В. Разработка способа быстрой регенерации клевера лугового *Trifolium pratense* L. // Биотехнология. — 2001. — № 6. — С. 19–24.
2. Стефанович А. М., Ревенкова Е. В., Ралдугина Г. Н. Получение трансгенных растений клевера (*Trifolium pratense*), устойчивых к гербициду фосфинотрицину (БАСТА) // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1994. — № 5. — С. 37–41.
3. Carrillo J. C., Ojeda V. A., Campos De Quiroz H. A., Ortega F. M. Optimization of protocol for direct organogenesis of red clover (*Trifolium pratense* L.) meristems for breeding purposes // Biol. Res. — 2004. — Vol. 37. — P. 45–51.
4. Phillips G. C., Collins G. B. Virus symptom-free plants of red clover using meristem culture // Crop. Sci. — 1979. — Vol. 19. — P. 213–216.
5. Cheyne V. A., Dale P. J. Shoot tip culture in forage legumes // Plant Sci. Lett. — 1980. — Vol. 19. — P. 303–309.
6. Rybczynski J. J. Plant regeneration in highly embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of *Trifolium fragiferum* L. (*Leguminosae*) // Plant Cell

- Tissue and Organ Culture. — 1997. — Vol. 51. — P. 159–170.
7. Kaushal P., Tiwari A., Roy A.K., Malaviya D.R., Kumar B. *In vitro* regeneration of *Trifolium glomeratum* // *Biologia Plantarum*. — 2006. — Vol. 50, № 4. — P. 693–696.
 8. Gamburg O.L., Eveleing D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* — 1968. — Vol. 46, № 5. — P. 417–421.
 9. Близнюк Л.Г. Использование биотехнологических методов в селекции клевера лугового // *Материалы международной конференции "Молекулярная генетика и биотехнология"*. — Минск. — 1998. — С. 146–147.
 10. Близнюк Л.Г., Чакель Я.І., Гардзей І.Ф. Мікракланальнае размнажэнне канюшыны лугавой і поліплаідыя // *Весті АН БССР*. — 1990. — № 6. — С. 43–46.
 11. Близнюк Л.Г., Пайкова М.А., Шишлов М.П. и др. Соматические свойства генотипа клевера лугового, различающегося по ответной реакции на цитокинины в условиях *in vitro* // *Сб. "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития"*. — М. — 2004. — С. 154.
 12. Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Индуцированный морфогенез в культуре ткани клевера лугового // *Материалы IV между. науч. конф. "Регуляция роста, развития и продуктивности растений"*. — Минск. — 2005. — С. 29.
 13. Близнюк Л.Г., Шишлов М.П., Суховицкая Л.А., Сафронова Г.В., Фоменко Т.И., Кондрацкая И.П. Использование метода клонального микроразмножения в селекции клевера лугового // *Материалы III Международной научной конференции "Регуляция роста, развития и продуктивности растений"*. — Минск. — 2003. — С. 15.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 26.10.2007

РЕГЕНЕРАЦІЯ І МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) УКУЛЬТУРИ *IN VITRO*

В.Н. Решетников, Т.І. Фоменко,
Л.Г. Бердичевец, М.К. Малюш

ГНУ "Центральний ботанічний сад
НАН Біларусі"

Наведено результати досліджень за морфогенним потенціалом різних експлантів конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.). Показано перевагу використання сім'ядольних вузлів як експлантів для отримання активного морфогенезу *in vitro*. Розроблено метод регенерації та мікроклонального розмноження сортів конюшини. Найвищу морфогенну активність із усіх описаних сортів конюшини лучної мав сорт Вітебчанин.

Ключові слова: конюшина лучна, рослинна регенерація, мікроклональне розмноження, культура *in vitro*.

RED CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) REGENERATION AND MICROPROPAGATION *IN VITRO* CULTURE

V.N. Reshetnikov, T.I. Fomenko,
L.G. Berdichevets, M.K. Maljush

Investigation results on morphogenesis process of red clover (*Trifolium pratense* L.), different explants are presented. It was shown the advantage of cotyledonary nodes explants for active morphogenesis *in vitro* culture. Plant regeneration and micropropagation method of red clover cultivars was developed. Cultivar Vitebchanin has the most morphogenesis activity among investigated cultivars. Key words: red clover, plant regeneration, micropropagation, *in vitro* culture.