

2. *Виноградова Т.С.* Инструментальные исследования сердечно-сосудистой системы (справочник). – М.: Медицина, 1986. – 416 с.
3. *Гуменюк В.А., Семенова Я.С., Судаков К.В.* Электрофизиологические и вегетативные показатели эмоционального восприятия человеком динамичной цветомузыки // Физиология человека. – 2002. – №1. – С. 57–67.
4. *Дергаева И.А., Урванцев Л.П.* Влияние музыки на больных с пограничными нервно-психическими расстройствами // Ярославский психологический вестник. – М.; Ярославль, 2003. – Вып. 10. – С. 153–160.
5. *Костюченко А.Л., Костин Э.Д., Курыгин А.А.* Энтеральное искусственное питание в интенсивной медицине. – СПб.: Спецлит, 1996. – 332 с.
6. *Николаева Е.Н., Колосова О.Н., Яковлева А.П., Мельгуй Н.В.* Некоторые психофизиологические особенности здоровья студентов на Севере и возможность их коррекции // Вестник СВФУ. – 2012. – Т. 9, № 4. – С.25–32.
7. *Рыжов Ю.Н.* Влияние темпоритмической структуры музыки на психофизиологическое состояние человека // Психотехнологии в социальной работе / Под ред. В. В. Козлова. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – Вып. 10. – С. 203–208.
8. *Свидерская Н.Е., Королькова Т.А.* Влияние свойств нервной системы и темперамента на пространственную организацию ЭЭГ // Журнал высшей нервной деятельности. – 1996. – Т.46, №5. – С.849–858.
9. *Сергиенко Е.А., Виленская Г.А.* Роль темперамента в развитии регуляции поведения // Психологический журнал. – 2001. – Т.22, № 3. – С. 68–85.
10. *Суворов Г.А., Прокопенко Л.В.* Акустические колебания: шум, инфразвук, ультразвук эколого-гигиеническая оценка и контроль. – М., 2000. – 216 с.
11. *Шушарджан С. В.* Музыкаотерапия. Музыкаотерапия и резервы человеческого организма. – М., 1998. – 145 с.
12. *Hughes J., Daaboul Y., Fino J., Shaw G.* The Mozart effect on epileptiform activity // Clin. Electroencephalogr. – 1998. – Vol. 29, N.3. – P. 109–119.
13. *Kim S. J.* The Effects of Music on Pain Perception of Stroke Patients During Upper Extremity Joint Exercises // Journal of Music Therapy. – 2005. – Vol. 42, N.1. – P. 81–92.
14. *Lane R., McRae K., Reiman E. et al.* Neural correlates of heart rate variability during emotion // NeuroImage. – 2009. – Vol. 44, N. 1. – P. 213–222.
15. *Timmers M., Fischer A., Manstead A. S. R.* Gender differences in motives for regulating emotions // Personality and Social Psychology Bulletin. – 1998. – № 24. – P. 974–985.
16. *Wahbeh H., Calabrese C., Zwickey H.* Binaural beat technology in humans: a pilot study to assess psychologic and physiologic effects // J. Altern Complement Med. – 2007. – Vol. 13, N.1. – P. 25–32.

Поступила в редакцию 05.10.2015

Общая биология

УДК 581.143.6: 633.36

Морфогенез эспарцета песчаного *in vitro* и его регуляция с помощью гуминовых кислот торфа и нанобиокомпозитов

О.А. Рожанская*, Н.В. Барашкова**, Т.В. Шилова*, В.Г. Дарханова**, Н.С. Строева**

*Сибирский НИИ кормов СО РАН, г. Новосибирск

**Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

*Изучено влияние минерального состава питательных сред и новых стимуляторов роста из растительного сырья на морфогенез эспарцета (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC) в культуре тканей *in vitro*. Новые стимуляторы роста из растительного сырья, введенные в состав питательных сред для рекуррентной регенерации и микроклонального размножения эспарцета в концентрации 0,5–1 мг/л, влияют на морфогенез и позволяют заменять дорогостоящие синтетические цитокинины и ауксины, сократить сроки культивирования *in vitro* в 1,5–2 раза, увеличить выход побегов и частоту ризогенеза на*

*РОЖАНСКАЯ Ольга Александровна – д.б.н., зав. лаб.; **БАРАШКОВА Наталья Владимировна – д. с.-х. н., зав. лаб., BNW-07@yandex.ru; *ШИЛОВА Татьяна Васильевна – с.н.с.; **ДАРХАНОВА Валентина Гаврильевна – н.с.; **СТРОЕВА Наталья Семеновна – н.с.

15–90%. При этом эффективность антисептической обработки семян эспарцета с помощью смеси этанола и перекиси водорода достигает 97%, лабораторная всхожесть асептических семян – 72%. Разработаны протоколы рекуррентной регенерации с участием нанобиокомпозитов как заменителей синтетических фитогормонов. Новые селекционные биотехнологии предназначены для создания высокопродуктивных и долгодетных форм эспарцета, устойчивых к условиям криолитозоны.

Ключевые слова: эспарцет песчаный, *in vitro*, рекуррентная регенерация, регуляторы роста, нанобиокомпозиты.

Morphogenesis of the *Onobrychis Arenaria* In Vitro and Its Control by Using Peat Humic Acids and Nano-Biocomposites

O.A. Rozhanskaya*, N.V. Barashkova**, T.V. Shilova*, V.G. Darkhanova**, N.S. Stroevea**

*Scientific Research Institute of Fodder SB RAS, Novosibirsk

**Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk

*The influence of a mineral composition of the nutrient solutions and new growth stimulants from a vegetable origin raw materials on the morphogenesis of *Onobrychis arenaria* in a culture of the tissue in vitro studied. The new growth stimulants from a vegetable origin raw materials, which were put into composition of the nutrient media for the recurrent regeneration and the micro-cloning multiplication of the onobrychis in concentration 0.5–1 mg/l, have an effect on the morphogenesis and permit to change the expensive synthetical cytokinins and the auxins, reduce the cultivation's time in vitro in 1.5–2 times, increase the appearance of the scions and the frequency of rhizogenesis by 15–90%. The effectiveness of the antiseptic treatment of the seeds of the onobrychis with a mixture of ethanol and hydrogen dioxide achieves 97 % and the germination of the aseptical seeds under laboratory conditions is 72 %.*

The protocols of the recurrent regeneration with nano-biocomposites as the alternatives of the synthetical plant hormones are worked out. The new selection biological technologies are applicable for creation of highly productive and longeval forms of onobrychis, which are resistant in conditions of the cryolithic zone.

Key words: *onobrychis arenaria*, *in vitro*, recurrent regeneration, regulators of the growth, nano-biocomposites.

Введение

Изучение особенностей морфогенеза *in vitro* кормовых растений, широко распространённых в естественных ценозах Якутии и пригодных к хозяйственному использованию, позволяет применять селекционные биотехнологии в направлении повышения адаптивности.

Эспарцет песчаный (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC) относится к особо ценным кормовым травам, поскольку кормовая масса его богата белком и не вызывает тимпанита у скота, растение устойчиво к засухе, толерантно к солонцеватым и щелнистым почвам с бедным минеральным составом. Однако произрастающий на лугах и в редколесьях Якутии эспарцет сибирский (*Onobrychis sibirica* (Širj.) Turcz. ex Grossh. [1], по нашим наблюдениям, не отличается долголетием, имеет небольшую надземную массу, а плоды его быстро осыпаются по мере созревания. В Якутии нет сортов эспарцета, адаптированных к условиям криолитозоны.

Для формирования популяций растений-регенерантов мы используем технологию рекуррентной регенерации, обеспечивающую отбор на

устойчивость к абиотическим и биотическим повреждающим факторам [2]. Эффективность автоселекции адаптивных генотипов растёт с увеличением числа пассажей [3]. Данная технология предусматривает чередование регенерационных циклов и микроклонального размножения, поэтому сроки создания популяций, пригодных для селекции, зависят от частоты реализации морфогенеза и продолжительности пассажа. Основной циклического процесса также может послужить вторичная регенерация из каллусов, сформировавшихся у оснований побегов в процессе клонирования первичных регенерантов [4].

Цель исследований – разработка и совершенствование методик культивирования *in vitro* эспарцета для создания высокопродуктивных и долгодетных форм, устойчивых к условиям криолитозоны. Поставленные задачи включают изучение влияния новых стимуляторов роста из растительного сырья как химических факторов, инициирующих и стимулирующих определённые типы морфогенеза в эксплантах тканей эспарцета.

Материалы и методы исследования

Для проведения экспериментов *in vitro* использовали семенной материал эспарцета песчаного СибНИИК 30 и сложногогибридных популяций соматклонов СГП-11, СГП-12, СГП-13. Семена, очищенные от плодовых оболочек, дезинфицировали и проращивали на безгормональных питательных средах. Асептические растения служили источником эксплантов для каллусообразования и регенерации. Ткани инкубировали при 16-часовом фотопериоде, освещенности 2000 лк, температуре 21°C. Применяли питательные среды с минеральным составом по Гамборгу (B5) или Мурасиге-Скугу (MS) [5,6]. Фитогормоны и экспериментальные регуляторы роста добавляли в питательную среду перед автоклавированием.

Новый биостимулятор ГКst, предоставленный лабораторией агроэкологии Томского государственного педагогического университета – водный раствор высокомолекулярных веществ из стандартного образца торфа 1S103H (США) с концентрацией гуминовых кислот 0,1% [7]. Регуляторы роста – нанобиокомпози́ты разработаны и изготовлены в Институте химии твёрдого тела и механохимии СО РАН методами механохимической активации растительного сырья: КЛ – из коры лиственницы, МП05 – из хвои пихты, аминокумат АГ12 – из бурого угля с добавкой соевого белка [8–10].

Опыты имели 3 повторности во времени, объем выборки в каждом варианте составлял 20–30 эксплантов. Различия средних оценивали с помощью критерия Фишера или непараметрических критериев статистики [11].

Результаты и обсуждение

Опыт 1. Изучено влияние минерального состава питательных сред на морфогенез проростков из асептических семян эспарцета (табл. 1). На среде MS всхожесть была выше на 10%, чем на среде Гамборга половинного состава (1/2B5), однако выход асептических растений снижался из-за повышенной частоты инфекции. Скорость роста и развития побега была несколько выше на среде 1/2B5. Поскольку эта среда содержит значительно меньше солей и углеводов, чем MS, её использование представляется более выгодным в экономическом отношении.

Опыт 2. Сравнительное изучение влияния синтетического цитокинина БАП и препарата ГКst проведено в культуре тканей листовых и корневых эксплантов эспарцета (табл. 2). На среде MS без экзогенных регуляторов роста (контроль) морфогенные структуры в листовых тканях не формировались, хотя средний объем экспланта увеличился более чем вдвое. В тканях

Т а б л и ц а 1

Влияние минерального состава питательной среды на прорастание семян эспарцета *in vitro* после дезинфекции (период инкубации 26 сут)

Показатели морфогенеза	Питательная среда	
	1/2B5	MS
Всхожесть, %	68	78
Доля инфицированных проростков, %	7	12
Высота побега, см	7,4±0,6	6,0±0,5*
Число листьев на побег	2,4±0,2	2,3±0,2
Длина корня, см	4,8±0,3	5,0±0,3

*Разница средних арифметических достоверна на 5%-м уровне значимости.

Т а б л и ц а 2

Влияние цитокинина БАП и препарата из торфа ГКst на морфогенез в тканях листовых и корневых эксплантов эспарцета *in vitro* (период инкубации 35 сут)

Показатели морфогенеза	MS без добавок (контроль)		MS + БАП 0,5 мг/л		MS + ГКst 1 мл/л	
	Лист	Корень	Лист	Корень	Лист	Корень
Происхождение экспланта						
Частота каллусогенеза, %	0	40	93	100	7	33
Объем каллуса, см ³	0	0,3	0,07	0,4	0,003	0,3
Объем экспланта по отношению к исходному, %	266	373	100	100	210	515
Частота регенерации, %	0	13	40	33	0	0
Число регенерантов на эксплант	0	1,0	2,3	3,0	0	0

корневого происхождения, напротив, обнаружена довольно высокая эндогенная биологическая активность: почти половина эксплантов приступила к каллусогенезу, причём на каждом третьем каллусе начался спонтанный эмбриогенез и возникло растение-регенерант.

В присутствии БАП почти все листовые экспланты сформировали каллус, в котором с частотой 40% происходил эмбриогенез и развивались 2–3 растения-регенеранта. Корневые ткани на среде с БАП увеличили частоту каллусогенеза до 100%, частоту регенерации в – 2,5 раз, число регенерантов на эксплант – втрое. Препарат ГКst в культуре листовых тканей продемонстрировал слабую морфогенную активность, вызвав образование небольших каллусов с частотой 7%, причём регенерация отсутствовала, как на безгормональной среде. В культуре корневых тканей добавка ГКst, очевидно, препятствовала действию эндогенных регуляторов роста, снизив частоту каллусообразования и исключив регенерацию.

Интересно, что при некотором сходстве морфогенных ответов на БАП и ГКst в отношении каллусогенеза и регенерации обнаружилось различие их действия на объём экспланта, а именно: эндогенные гормоны вызывали увеличение объёма, БАП блокировал этот процесс, а препарат ГКst стимулировал рост объёма корневых эксплантов. Поскольку увеличение размеров экспланта обусловлено эффектом растяжения клеток, присущим ауксинам, можно предположить ауксиновую активность у препарата ГКst. Очевидно, в эндогенном комплексе корневых тканей эспарцета при наличии ауксинов преобладают цитокинины.

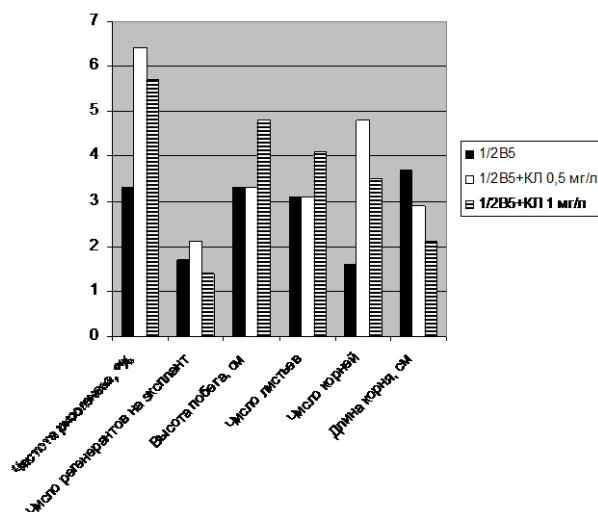
Опыт 3. Изучено влияние нанобиокомпозита из коры лиственницы КЛ на развитие эмбрионов эспарцета из листового каллуса в течение 6 недель (рисунок). Наиболее значимым эффектом препарата явилось повышение частоты ризогенеза почти вдвое, а также увеличение количества растений-регенерантов на 24% и числа корней втрое под действием добавки КЛ в дозе 0,5 мг/л. Удвоенная доза препарата способствовала повышению частоты ризогенеза на 68% по сравнению с безгормональной средой, ускорению роста побегов и развития листьев и корней на 45, 32 и 119% соответственно.

Таким образом, использование в составе питательной среды препарата из коры лиственницы в концентрации 0,5–1 мг/л сокращает сроки культивирования эспарцета *in vitro* в 1,5–2 раза.

Опыт 4. Проведено сравнительное изучение влияния двух регуляторов роста: синтетического ауксина НУК (α -нафтилуксусная кислота) и препарата МП05 на развитие почек эспарцета в процессе микроклонального размножения (табл. 3). Добавки НУК и МП05 в дозе 1 мг/л увеличили количество развивающихся побегов на 20 и 30% соответственно, способствуя появлению новых адвентивных побегов.

Естественно, средняя высота побегов и количество листьев при этом уменьшились. Кроме того, оба препарата в первый месяц снизили вдвое частоту ризогенеза по сравнению с безгормональной средой. Очевидно, в биологической системе почек эспарцета *in vitro* нанобиокомпозит МП05 в изученной дозе проявил активность ауксинового типа и пригоден для замены НУК. Анализ результатов эксперимента также показал, что второй месяц культивирования незначительно увеличивает показатели морфогенеза, поэтому целесообразно 1-месячные безкорневые побеги эспарцета со среды с добавкой МП05 паспортировать на безгормональную среду для укоренения.

Опыт 5. Изучение влияния аминоксимата АГ12 проводили посредством добавления препарата



Влияние нанобиокомпозита КЛ на развитие эмбрионов эспарцета из листового каллуса (период инкубации 6 недель)

Т а б л и ц а 3

Влияние ауксина НУК и нанобиокомпозита МП05 на развитие побегов из почек эспарцета *in vitro*

Показатели морфогенеза	1/2B5 без гормонов (контроль)		1/2B5 +НУК 1 мг/л		1/2B5 + МП05 1 мг/л	
	25	60	25	60	25	60
Период инкубации, сут	25	60	25	60	25	60
Число побегов на эксплант	1,0	1,1	1,2*	1,3*	1,3*	1,4*
Высота побега, см	3,8	5,6	3,0*	3,9*	3,2*	3,8*
Число листьев на побег	2,4	3,8	1,6*	3,1*	1,4*	3,0*
Частота ризогенеза, %	40	67	21*	61	21*	31*
Число корней на эксплант	1,6	3,6	1,8	4,1	4,0*	4,1
Длина корня, см	1,9	2,4	4,0*	6,0*	1,5	3,7*

*Разница средних арифметических с контролем достоверна на 5%-м уровне значимости.

перед автоклавированием в питательную среду 1/2B5 в концентрации 1 мг/л. В качестве эксплантов использовали почки асептических растений эспарцета в фазе розетки. Результаты представлены в табл. 4.

Препарат достоверно стимулировал индукцию ризогенеза, увеличив его частоту на 15% и обеспечив за 1,5–2 месяца полное укоренение побегов. Кроме того, под действием аминоксимата достоверно повысилась на 10% облиственность растений и на 9% их высота.

Таким образом, применение АГ12 в дозе 1 мг/л позволяет ускорить процесс микроклонального размножения эспарцета и увеличить его эффективность.

Учитывая особенности регуляторной активности препаратов АГ12 и МП05 (табл. 3), для повышения эффективности микроклонального раз-

Т а б л и ц а 4

Влияние нанобиокомпозита АГ12 на развитие побегов из почек эспарцета *in vitro*

Показатели морфогенеза	1/2B5 без добавок (контроль)		1/2B5 + АГ12 1 мг/л	
	27	58	27	58
Период инкубации, сут	27	58	27	58
Число побегов на эксплант	1,0	1,1	1,0	1,1
Высота побега, мм	58	60	53	65
Число листьев на побег	4,5	7,3	4,4	8,1*
Частота ризогенеза, %	45	85	55*	100*
Число корней на эксплант	3,3	3,5	3,0	3,3
Длина корня, мм	27	21	17*	22

*Разница средних арифметических с контролем достоверна на 5%-м уровне значимости.

множения эспарцета можно рекомендовать следующий протокол:

- 1) 1-месячная инкубация эксплантов почек на среде 1/2B5 с добавкой МП05 в дозе 1 мг/л;
- 2) пассирование неукоренённых побегов на среде 1/2B5 с добавкой АГ12 в дозе 1 мг/л.

Выводы

1. Эффективность антисептической обработки семян эспарцета с помощью смеси этанола и перекиси водорода достигает 97%, лабораторная всхожесть асептических семян – 72%.

2. Новые стимуляторы роста из растительного сырья, введённые в состав питательных сред для рекуррентной регенерации и микроклонального размножения эспарцета в концентрации 0,5–1 мг/л, влияют на морфогенез и позволяют заменять дорогостоящие синтетические цитокинины и ауксины, сократить сроки культивирования *in vitro* в 1,5–2 раза, увеличить выход побегов и частоту ризогенеза на 15–90%.

3. Для повышения эффективности микроклонального размножения эспарцета рекомендуется следующий протокол: 1-месячная инкубация эксплантов почек на среде 1/2B5 с добавкой МП05 в дозе 1 мг/л с последующим пассирова-

нием неукоренённых побегов на среду 1/2B5 с добавкой АГ12 в дозе 1 мг/л.

Литература

1. Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. – Л.: Наука, 1981. – 510 с.
2. Рожанская О.А. Создание исходного материала для селекции кормовых культур в условиях Сибири с помощью методов биотехнологии: Автореф. дис. ... д.б.н. – СПб., 2007. – 33 с.
3. Рожанская О.А., Дарханова В.Г., Строева Н.С. Автоселекция *in vitro* эспарцета песчаного на адаптивность // Сиб. вест. с-х. науки. – 2011. – №3–4. – С. 131–134.
4. Рожанская О.А., Дарханова В.Г., Строева Н.С. и др. Особенности регуляции морфогенеза эспарцета и люцерны *in vitro* // Сиб. вест. с-х. науки. – 2008. – №5. – С. 58–65.
5. Gamborg O.L. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // Exp. Cell Res. – 1968. – V. 50. – P. 151–158.
6. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. plant. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
7. Рожанская О.А., Инишева Л.И., Ларина Г.В. Характеристика биологической активности препаратов гуминовых кислот торфов в культуре тканей растений // Сиб. вест. с-х. науки. – 2013. – №3. – С. 20–27.
8. Korolev K.G., Lomovskij O.I., Rozhanskaya O.A., Vasil'ev V.G. Mechanochemical preparation of water-soluble forms of triterpene acids // Chem. Natural compounds. – 2003. – 39:4. – P. 366–372.
9. Патент РФ № 2267927. Биостимулятор роста растений / К.Г. Королев, О.И. Ломовский, О.А. Рожанская. – Опубл. в Б.И. – 2006. – № 2.
10. Дарханова В.Г., Строева Н.С., Королев К.Г. и др. Применение нанобиокомпозитов для стимуляции роста растений *in vitro* / Материалы II Международного форума по нанотехнологиям (Москва, 6–8 октября 2009 г.) <http://rusnanotech09.rusnanoforum.ru/cgi-bin/show.pl?option=&id=&lang=ru>.
11. Сорокин О. Д. Прикладная статистика на компьютере. – Краснообск: ГУП РПО СО РАСХН, 2004. – 162 с.

Поступила в редакцию 25.03.2015