

УДК. 623.16:581.1.037:635.21

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ПРЯМУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОРНЕВЫХ И СТЕБЛЕВЫХ ЭКСПЛАНТОВ КАРТОФЕЛЯ IN VITRO**

Ч. СУБД, Н. Н. ТРЕТЬЯКОВ, В. Н. ОВЧИННИКОВА\*,  
О. С. МЕЛИК-САРКИСОВ\*, А. И. ШАРОВА\*.

(Кафедра физиологии растений)

Изучали влияние электростатического поля на прямую регенерацию корневых и стеблевых эксплантов картофеля *in vitro*. В ряде вариантов отмечена интенсификация процесса прямой регенерации на стеблевых и корневых эксплантах картофеля под воздействием электростатическими полями напряженностью  $E = +10$  кВ/м и  $E = -10$  кВ/м. Отмечена сортовая особенность реакции. Электростимуляция перспективна при регенерации растений в культуре ткани, в т.ч. трансгенных растений, где необходима ускоренная регенерация с целью предотвращения нежелательной соматклональной изменчивости.

Регенерация растений путем органогенеза состоит в появлении побегов однополосных структур. Побеги могут быть физически связаны с тканью экспланта, могут появляться из дедифференцированных каллусных клеток или образовываться в результате активации роста скрытых стеблевых инициалей [9]. Таким образом, регенерация растений может осуществляться посредством непрямого органогенеза (через стадию каллусогенеза) и прямого (непосредственно из тканей экспланта).

Прямая регенерация дает возможность получать растения-регенераты без дедифференцировки экспланта, минуя стадию каллусогенеза, и соответственно с минимальной вероятностью получения нежелательных соматклональных форм. Прямая регенерация обычно происходит непосредственно на среде индукции, т.е. не требует пассажей с последовательной сменой нескольких гормональных вариантов сред, что экономически выгодно и при этом ускоряется процесс

получения регенерантов. Такие преимущества прямой регенерации позволяют использовать данный метод и в экспериментах по генетической трансформации растений.

Прямая регенерация растений может осуществляться двумя различными путями: через формирование соматических эмбриоидов непосредственно на тканях экспланта (чаще всего незрелых зародышей) и через образование адвентивных побегов из меристематических тканей экспланта [1].

Процесс прямой регенерации, помимо определяющей роли генотипа, зависит от типа экспланта, гормонального состава культуральной среды и некоторых других особенностей культивирования, в т.ч. и от влияния физических факторов [7].

Одним из способов повышения морфогенетической активности культивируемых тканей является их электростимуляция. В условиях электростатического поля не только увеличивалась интенсивность прямой реге-

\* ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Работа выполнена в рамках программы ФЦП «Интеграция».

нерации на эксплантах листовых дисков ряда культур (вишни, земляники, киви), но даже наблюдалось образование эмбрионоподобных структур у груши, чего не отмечалось в контроле [4].

Воздействие электростатического поля на этапе микроразмножения проявилось в увеличении дополнительной пролиферации пазушных почек и усилении роста микропобега. Электростатическое поле уменьшает величину пластохрона. Это обеспечивает увеличение количества зачаточных листьев (места синтеза ауксинов), стимулирует рост меристематических верхушек в длину [3, 8].

Формированию дифференцированных структур всегда предшествует поляризация клетки, где ведущая роль принадлежит возникновению биоэлектрических потенциалов [6].

Появление эндогенных электрических токов, входящих в растущие и выходящих из закончивших рост участков клетки, является одной из наиболее ранних реакций растений в процессе дифференцировки растительных клеток, характеризующихся полярным типом роста (зиготы водорослей, прорастающая пыльца, корневые волоски, зародыши и др.). Эти электрические токи, как правило, предшествуют морфологическим изменениям. Поляризация и в первую очередь возникновение электрических токов имеют важное значение и на дальнейших этапах роста и развития зародыша [13-14].

При действии постоянным электрическим током (контактным способом) силой 1 мкА на 70% увеличивался прирост массы каллуса и в 5 раз повышалась частота побегообразования [11-12]. Пропускание постоянного тока силой 2 мкА через каллусные инокулюмы кукурузы вызывало усиление роста тканей и значительное повышение частоты формирования корней, почек и побегов [5].

Можно предположить, что в условиях стресса клетки выходят за норму реакции данной программы дифференцировки, свойственную клеткам растений, и могут переходить на другую программу, в т.ч. и морфогенетическую. Известно, что многие морфогенетические эффекты могут проходить только при определенных электрических потенциалах на мембранах клетки [2].

Вместе с тем не определено влияние силы, направления и продолжительности воздействия электростатического поля и прямого электрического тока, а также состояния обрабатываемых тканей на морфогенез.

В связи с этим задачей данной работы был анализ эффективности воздействия электростатическими полями, положительной и отрицательной направленности на процесс прямой регенерации корневых и стеблевых эксплантов картофеля различных генотипов (сортов).

## Методика

Исследования проводили в лаборатории физиологии растений МСХА и в лаборатории безвирусных культур ВНИИ СБ РАСХН. В опыте использовали пробирочные растения картофеля сортов Удача, Романо, Шийр 6 (монгольской селекции).

Экспланты — отрезки стеблей без почек и отрезки корней размером 1 см — помещали в чашки Петри на культуральные среды Мурасиге и Скуга, различающиеся по составу гормонов (табл. 1). Такой гормональный состав сред наиболее эффективен для процесса прямой регенерации картофеля для выбранных нами типов эксплантов [10].

Чашки Петри с эксплантами помещали в электростатические поля с экспериментально определенными в предыдущих опытах параметрами: +10 кВ/м и -10 кВ/м [8].

Гормональный состав сред (мг/л)

№ среды	Тип экспланта	ИУК	Зеатин	6—БАП	ГК	НУК
1	Корни	1,0	1,0	—	10,0	—
2	— » —	1,0	—	1,0	10,0	—
3	Стебли	—	1,0	2,5	—	0,1
4	— » —	0,2	5	—	—	—

Электростатические поля создавали генератором высокого напряжения В-524. Один полюс источника тока соединен с токопроводящей пластиной, на которой устанавливаются штативы с пробирками, другой — с металлической сеткой 2x2 мм, расположенной над нижней пластиной на высоте 25-30 см. Напряженность электростатического поля между пластинами зависела от напряженности ( $U$ ) тока, подаваемого на пластины установки, и расстояния ( $l$ ) между пластинами.\*

Воздействие электростатическим полем на экспланты было постоянным в течение всего пассажа и продолжалось 30 дней. Опыты проводились в 6-кратной повторности.

Культивирование вели в климатической камере «Фитотрон» кафедры физиологии растений при 16-часовой продолжительности светового дня и температуре +20°C ночью и +25°C днем, освещенности 3000 лк (ДРИ-2000-6).

### Результаты и их обсуждение

**Прямая регенерация корней.** В опыте использовали культуральные среды, различающиеся только по качественному составу цитокининов. В культуральную среду №1 был добавлен зеатин в концентрации 1 мг/л, в составе среды №2 — 6-БАП в такой же концентрации. Экзогенные фитогормоны являются основным средством индукции морфогенеза в культуре *in vitro* растений, в т.ч. и у картофеля.

Проявилась зависимость эффективности прямой регенерации от сорта и регуляторов роста под влиянием электростатических полей различной направленности.

У сорта *Удача* в контрольном варианте ( $E = 0$  кВ/м) не отмечено разницы во влиянии гормонов на изучаемый процесс. Образование узлов (точек) регенерации на эксплантах развивалась равномерно в течение всего

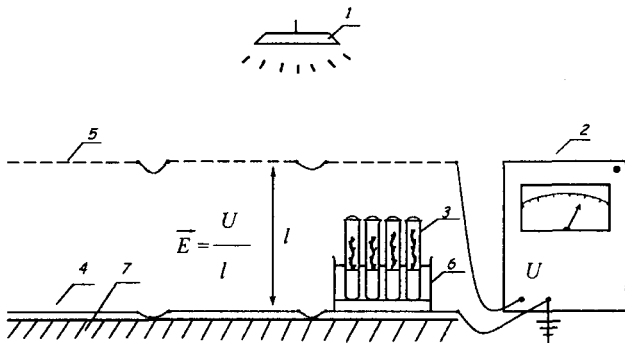


Схема. 1 — источник света, 2 — генератор тока высокого напряжения, 3 — пробирки с культивируемыми растениями, 4 — токопроводящая нижняя пластина, 5 — токопроводящая верхняя сетка с ячейками 2x2 мм, 6 — штативы, 7 — диэлектрическое основание

\* П р и м е ч а н и е. Установка создана при участии Н. А. Голика и О. С. Фанталова.

периода культивирования (10, 20, 30 дней) и достигла к концу пассажа 76,4% на среде с 6-БАП и 78,5% на среде с зеатином (рис. 1, 2).

В то же время под воздействием электростатических полей как положительной, так и отрицательной направленности на среде с зеатином не только увеличивалось образование морфогенных узлов, но и ускорялся процесс. Так, уже через 20 дней культивирования у 100% корневых эксплантов этого сорта в поле напряженностью ( $E = +10$  кВ/м) образовались морфогенные узлы. Электростатическое поле ( $E = -10$  кВ/м) в меньшей степени активизировало регенерацию. За 30 дней этот процесс составил 86,8% (рис. 1).

На среде с 6-БАП у данного сорта под воздействием электростатических полей как положительной, так и отрицательной направленности одинаково увеличивалась прямая регенерация корневых эксплантов картофеля — соответственно на 20,1 и 17,1% по сравнению с контролем (рис. 2).

У сорта монгольской селекции *Шийр 6* на среде регенерации с зеатином не наблюдалось положительной реакции корневых эксплантов на воздействие электростатических полей. Так, при воздействии ( $E =$

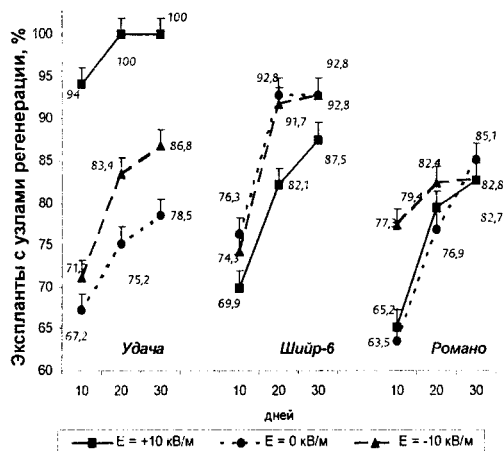


Рис. 1. Динамика регенерации корневых эксплантов на среде регенерации (корни-1), %

$= -10$  кВ/м) показатели регенерации эксплантов на 30-й день не превышали контрольный вариант. Кроме того, даже наблюдалось ингибирование данного процесса при ( $E = +10$  кВ/м) (рис. 1).

В то же время на средах с 6-БАП через 30 дней отмечали 100%-ю регенерацию под воздействием электростатического поля ( $E = -10$  кВ/м), при положительной направленности ( $E = +10$  кВ/м) реакция эксплантов не отличалась от контрольного варианта (рис. 2).

Аналогично и у сорта *Романо* на среде с зеатином не отмечено различий между контролем и вариантами с воздействием электростатическими полями как положительной, так и отрицательной направленности. Через 30 дней культивирования процент регенерации составил соответственно 82,8 и 82,8% (рис. 1).

В то же время на средах с 6-БАП уже через 20 дней отмечали 99,5%-ю регенерацию под воздействием электростатического поля ( $E = -10$  кВ/м). Реакция эксплантов на воздействие электростатического поля положительной направленности ( $E = +10$  кВ/м) была немного ниже, чем в контрольном варианте (рис. 2).

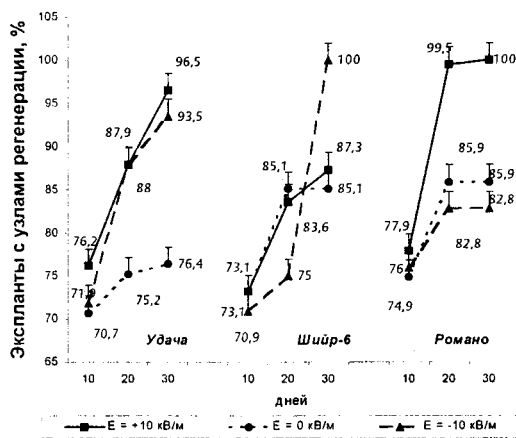


Рис. 2. Динамика регенерации корневых эксплантов на среде регенерации (корни-2), %

Таким образом, можно сделать вывод, что при воздействии электростатическими полями на процессы прямой регенерации корневых эксплантов картофеля проявилось характерное для этого процесса влияние генотипа (сорта) и состава культуральной среды. В ряде случаев отмечен максимальный процент регенерации уже на 20-й день экспозиции эксплантов в электростатических полях. Наблюдаемое варьирование показателей регенерации в вариантах опыта, очевидно, объясняется также и гетерогенностью корневых эксплантов растений одной линии (сорта).

**Прямая регенерация на стеблевых эксплантах.** В среде регенерации № 3 использовали гормоны в следующих концентрациях: 6-БАП (2,5 мг/л), также зеатин (1 мг/л) с НУК (0,1 мг/л), а в среде №4 содержание зеатина было выше — 5 мг/л и 0,2 мг/л ИУК.

Прямая регенерация на стеблевых эксплантах картофеля в отличие от корневых эксплантов проявилась на 30-й день. На среде с 6-БАП и зеатином у всех трех сортов было отмечено положительное влияние на данный процесс обработки электростатическими полями как положительной, так и отрицательной направленности.

У сорта *Удача* почти одинаковый стимулирующий эффект получен и при положительном и отрицательном электростатических полях. Регенерация на стеблевых эксплантах на 13-15% превышала контрольный вариант (рис. 3). У сортов *Шийр 6* и *Романо* регенерация была существенно выше под воздействием отрицательного поля соответственно на 23 и 15,5%. Положительные поля лишь незначительно (на 5%) у обоих сортов увеличивали регенерацию на стеблевых эксплантах (рис. 3).

Одинаковую реакцию на воздействие электростатических полей на

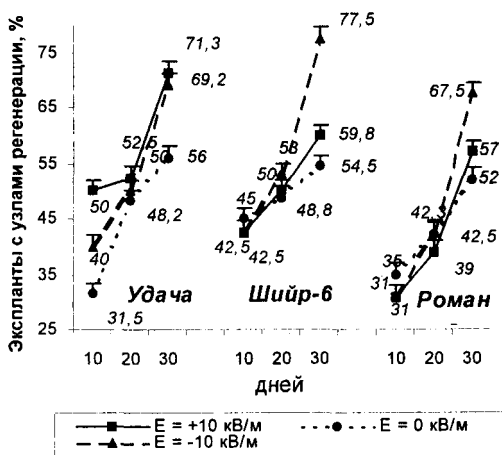


Рис. 3. Динамика регенерации стеблевых эксплантов при среде регенерации (стебли-1), %

среде с зеатином и ИУК показали сорта *Удача* и *Шийр 6*. В данном случае только положительное электростатическое поле способствовало увеличению выхода регенерантов на 15% по сравнению с контролем. Отрицательное электростатическое поле на 5-7% снижало регенерацию в сравнении с контролем (рис. 4). У сорта *Романо* регенерация в условиях положительного электростатического поля была почти на 11% меньше, чем в контроле. Различия между контрольным вариантом и воздействием отрицательным полем незначительны (3%).

В случае стеблевых эксплантов так же, как и при прямой регенерации корневых эксплантов, наблюдались различия в реакции генотипа (сорта) и гормонального состава культуральной среды при воздействии электростатических полей разной направленности.

**Выход регенерантов.** После 30 дней воздействия электростатических полей экспланты пересаживали на среды аналогичного гормонального состава. Учет выхода регенерантов определяли через 30 дней в конце

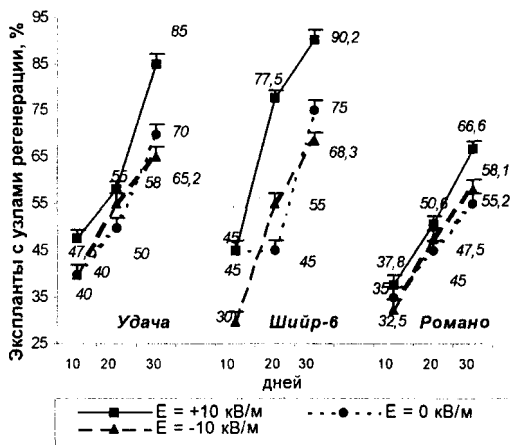


Рис. 4. Динамика регенерации стеблевых эксплантов на среде регенерации (стебли-2), %

второго пассажира. О выходе регенерантов можно судить по данным табл. 2.

Так, на корневых эксплантах при воздействии положительного электростатического поля ( $E = +10$  кВ/м) выход регенерантов в 5 вариантах из 6 был выше на 22-48%, чем в контроле. При воздействии отрицательного поля ( $E = -10$  кВ/м) увеличение составило от 10 до 41%, а в 2 вариантах этот показатель был ниже контроля.

На стеблевых эксплантах воздействие электростатическими полями во всех вариантах способствовало значительному увеличению выхода регенерантов. На среде № 4, содержащей ИУК с зеатином в концентрации 0,2 и 5 мл/л, у всех 3 сортов вы-

ход регенерантов был выше при воздействии электростатического поля  $E = +10$  кВ/м по сравнению с полем  $E = -10$  кВ/м. На среде № 3 (содержание зеатина, 6-БАП и НУК соответственно 2,5, 1 и 0,1 мл/л) при воздействии поля  $E = +10$  кВ/м этот показатель у сорта Удача был ниже, чем при воздействии поля  $E = -10$  кВ/м. У сорта Шийр 6 выход регенерантов был на 15% больше в варианте с воздействием поля  $E = +10$  кВ/м по сравнению с полем напряженностью  $E = -10$  кВ/м. У сорта Романо оба варианта не различались по количеству регенерантов.

Регенеранты, полученные на корневых и стеблевых эксплантах при воздействии исследуемых электростатических полей и сред, были морфологически выравнены и при дальнейшей пересадке укоренялись и давали нормально развитые растения.

#### Заключение

В результате эксперимента в ряде вариантов отмечена интенсификация процесса прямой регенерации на стеблевых и корневых эксплантах картофеля электростатическими полями напряженностью  $E = +10$  кВ/м и  $E = -10$  кВ/м. Выявлены различия в сортовых реакциях на воздействие электростатических полей. Следует отметить более устойчивые положительные действия на регенерацию как корневых, так и стеблевых эксплантов при воздействии электростатического поля  $E = +10$  кВ/м по всем вариантам сред у сорта Удача и по трем вариантам

Т а б л и ц а 2

Уровень напряженности ЭСП	Выход регенерантов (в % к контролю)			
	Среда регенерации			
	1-корни	2-корни	3-стебли	4-стебли
<b>Удача</b>				
$E = +10$ кВ/м	148	146	190	157
$E = -10$ кВ/м	111	115	204	103
<b>Шийр 6</b>				
$E = +10$ кВ/м	129	130	218	170
$E = -10$ кВ/м	83	141	203	161
<b>Романо</b>				
$E = +10$ кВ/м	122	122	185	265
$E = -10$ кВ/м	110	95	186	161

сред у сортов Шийр 6 и Романо. Эффективность воздействия поля  $E = -10$  кВ/м оказалась меньшей. Интенсивность морфогенетических процессов, очевидно, связана с такой характеристикой, как скороспелость или позднеспелость сортов. Морфогенетические процессы и регенерация как стеблевых, так корневых эксплантов были выше у скороспелых сортов Удача и Шийр 6 по сравнению с позднеспелым сортом Романо.

На корневых эксплантах регенерационные процессы шли интенсивнее по сравнению со стеблевыми в большинстве вариантов опыта с воздействием электростатическими полями и средам с различным содержанием гормонов (рис. 1, 2). Интенсивность регенерации корневых эксплантов достигала максимального значения уже на 20-й день, что делает возможным сократить сроки регенерации, чем при использовании стеблевых эксплантов. Большая эффективность электростимуляции при регенерации корневых эксплантов отмечена в среде, содержащей 6-БАП.

Однотипность реакции как корневых, так и стеблевых эксплантов на действие электростатических полей разной направленности, возможно, объясняется различиями в гормональном балансе этих органов (в результате их поляризации) в процессе регенерации, которые занимают на поверхности сред горизонтальное положение (не обычное для осевых органов).

Мы предполагаем, что электростимуляция перспективна при регенерации растений в культуре ткани, а также из трансгенных растений, где необходима ускоренная регенерация с целью предотвращения соматональной генетической изменчивости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балохина Н.В., Каяева М.А., Бурьянов Я.И. Разработка методов регенерации для проведения генетической трансформации

земляники лесной (*Fragaria vesca* L.). Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. — Тез. докл. VII Междунар. конф. 25-28 ноября, М., 1997. — 2. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro*. — Первое Чайлахановское чтение. М., 1994, с. 7-26. — 3. Деменко В.И., Каменская К.И., Третьяков Н.Н. и др. Электростимуляция роста и развития черной смородины в культуре *in vitro*. — Изв. ТСХА. 1994, вып. 2, с. 179-182. — 4. Деменко В.И., Каменская К.И., Третьяков Н.Н. Влияние электростатического поля на рост и развитие плодовых и ягодных растений *in vitro*. — Докл. ТСХА, 1995, вып. 226а, с. 107-110. — 5. Китлаев Г.Б., Диас С., Вера-Рамос Т.Ю. и др. Стимуляция слабым электрическим током регенерации растений в культуре тканей кукурузы. — Биотехнология, 2001, № 5, с. 58-63. — 6. Медведев С.С. Физиологические основы полярности растений. С.-Пб., 1996. — 7. Матушкина О.В. Индукция адвентивного органогенеза у различных типов эксплантов, культивируемых *in vitro*. Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. — Материалы II Междунар. науч. конф., 18-19 октября, М., 2000, с. 77-78. — 8. Сувд Ч., Овчинникова В.Н., Паничкин Л.А. и др. Регенерация меристем и рост черенков *Solanum tuberosum* L. при клональном микроразмножении *in vitro* под действием электростатического поля. — С.-х. биология, 2004, № 1, с. 73-78. — 9. Тиссераб. Эмбриогенез, органогенез и регенерация растений. — Биотехнология растений: культура клеток. М.: Агропромиздат, 1989, с. 97-126. — 10. Хромова Л.М., Бургутин А.Б., Седина Г.В. и др. Влияние фитогормонов на органогенез в каллусной культуре картофеля. — Тез. докл. I Всес. конф. «Регуляторы роста и развития растений». М., 1981, с. 180-181. — 11. Browley S.H., Wetherell D.F., Robinson K.R. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984, v.81, № 19, p. 6064-6067. — 12. Goldsworthy A. — New Scientist, 1986, N 1, p. 22-23. — 13. Robinson K.R., Jaffe L.F. — Science, 1975, v. 187, N 4171, p. 70-72. — 14. Weisen-seel M.N., Dorn A., Jaffe L.F. — Plant Physiol, 1979, v. 64, N 3, p. 512-518.

Статья поступила  
16 февраля 2004 г.

#### SUMMARY

Effect of electrostatic area on direct regeneration of root and stem explants of potato *in vitro* was studied. In a number of versions intensification of direct regeneration process was noted on stem and root potato explants under the influence of electrostatic areas with intensity  $E = +10$  mVm and  $E = -10$  mVm. Varietal feature of the reaction on the effect of electrostatic areas has been noted. Electrostimulation is long-term with plant regeneration in textile culture, including that of transgenic plants where accelerated reaction is necessary to prevent undesirable somaclonal variability.