

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПИВОВАРЕННОГО ЯЧМЕНЯ

Ч.А. КАРАБАЕВ

(Лаборатория безвирусных культур)\*

**В статье приведены данные исследований воздействия электростатического поля на разные линии пивоваренного ячменя сорта Ну тане с целью повышения выхода растений регенерантов для последующей библистической трансформации.**

В практическом использовании биотехнологических методов в растениеводстве по улучшению агрономических свойств некоторых с.-х. культур ученые сталкиваются с рядом проблем. Особенно это касается злаков и в наибольшей степени ячменя, из-за трудностей, связанных с регенерацией клеток в культуре *in vitro*. Как правило, в большинстве случаев из этих культивируемых клеток либо совсем не удаётся регенерировать растения, либо дифференцируются единичные регенеранты или альбиносные растения [1, 11, 13]. Тем не менее, существуют данные, свидетельствующие о возможности получения регенерантов ячменя из культуры пыльников и микроспор, апикальных меристем, фрагментов листа, зрелых и незрелых зародышей, соцветий и тканей завязи [12].

Поскольку трудности, связанные с регенерацией, являются одной из основных проблем при создании трансгенных растений ячменя наши исследования были направлены на активизацию процесса регенерации в культуре *in vitro* воздействием такого физического фактора, как электростатическое поле.

Из литературы известно, что электростатическое поле оказывает стиму-

лирующее влияние на рост и развитие плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*, увеличивает приживаемость апексов, линейный рост регенерантов и коэффициент размножения [2]. При пропускании через каллусные инокулюмы постоянного тока силой 2 мкА в течение 2 недель наблюдается усиление роста каллусной ткани, ризогенеза и соматического эмбриогенеза [7]. Известно, что воздействие электрического поля увеличивает выход зелёных регенерантов злаковых культур: кукурузы [4], картофеля [10], пшеницы, ячменя [5].

Исходя из вышеизложенного целью исследования было изучение морфогенеза разных сортов пивоваренного ячменя при воздействии электрического поля разного потенциала.

### Методика

Исследования проводили на разных линиях пивоваренного ячменя сорта Нутанс 278, 553 и 642. Объектом исследования служили незрелые зародыши, изолированные из зерновок на 10-16-й день после опыления. Зерновки стерилизовали 50%-м раствором «Белизна» (12-20 мин), после чего их промывали стерильной водой (3 раза).

\* ВНИИСБ.

Культивирование изолированных зародышей проводили на стандартной среде, содержащую макро- и микроэлементы, по прописи Мурасиге-Скуга, витамины — по Бутенко, 20 г/л сахарозы, 0,25 г/л мио-инозитола, 1,0 г/л гидролизата казеина, 0,69 г/л пролина, 8 г/л агар-агара.

В качестве регуляторов роста использовали: 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), БАП (6-бензиламинопурин). Выбор концентраций регуляторов роста и их соотношения определяли согласно проведённым нами исследованиям [6].

Для индукции морфогенеза использовали полученные ранее каллусные культуры, которые культивировали на среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 2,5 мг/л. Интенсивность каллусогенеза учитывали на 10-е и 20-е сутки культивирования.

Для индукции каллусообразования культуры выращивали в темноте, для индукции регенерации — при 16-часовом фотопериоде и освещённости 5-6 клк. Температуру в период культивирования поддерживали на уровне  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Электростатическое поле создавали генератором высокого напряжения В-524, размещённого вне камеры и питающегося от сети переменного напряжения 220 В. Один полюс соединяли с токопроводящей пластиной, на которой устанавливали штативы с пробирками. Другой полюс источника тока соединяли с металлической сеткой 2x2 мм, расположенной над нижней пластиной на высоте 25-30 см. Схема установки приведена на рисунке.

В экспериментах было изучено 3 варианта: 1 — контроль — культивирование незрелых зародышей на среде

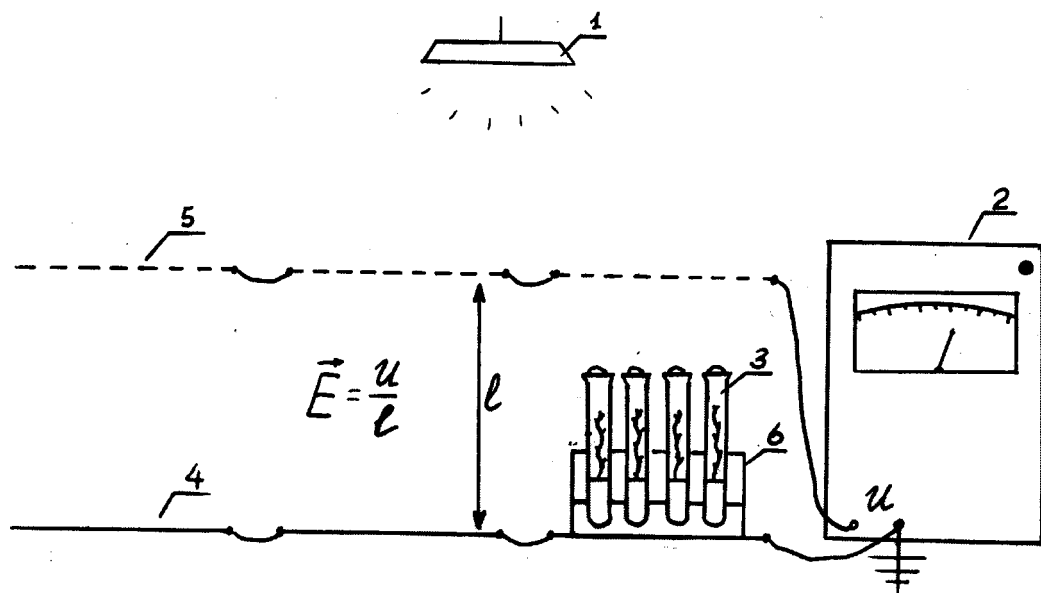


Схема установки для создания постоянного электрического поля (Н. А. Голик, О. С. Фанталов):

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

для морфогенеза (без воздействия электрического поля); 2 — культивирование зародышей на аналогичной среде под воздействием положительного заряда 10 кВ/м; 3 — культивирование зародышей на аналогичной среде под воздействием отрицательно заряда -10 кВ/м.

### Результаты и их обсуждение

Немногочисленные публикации свидетельствуют о том, что при отсутствии естественного электрического поля задерживаются физиологические процессы, ведущие к созданию органического вещества, наблюдается снижение интенсивности фотосинтеза и дыхания, происходит нарушение митерального обмена. Растения развиваются хуже, имеют менее зелёную окраску листьев [9]. Положительный эффект использования внешнего электрического поля получен на некоторых с.-х. растениях, в т. ч. и злаковых (пшеница) [3, 8].

Наши исследования показали, что при воздействии отрицательным зарядом электрического поля на культуру зародышей ячменя линии 278 количество морфогенных каллусов превышало контроль на 15%, тогда как при воздействии положительного заряда результат был практически такой же, как и в контрольном варианте (табл. 1).

Изучение воздействия времени экспозиции электрического поля показало, что при выращивании зародышей в

течение 20 сут под действием электрического поля происходит изменение морфофизиологии каллусной ткани. Данные, полученные нами, согласуются с литературными источниками [4].

Наши дальнейшие исследования, должны были выявить наиболее подходящие сорта и условия для культивирования пивоваренного ячменя отечественной селекции. В качестве объекта исследований выступили линии сорта Нутанс 278, 553 и 642. Данные, полученные в ходе эксперимента, приведены в табл. 2.

Анализ табл. 2 показал, что в воздействии отрицательного электрического поля положительно влияет на регенерацию сортов Нутанс 553 и 642, превышая контроль на 33 и 20% соответственно. При этом среднее количество регенерантов на 1 каллус составил 3,6 шт. у линии 553 и 2,8 шт. у линии 642, в то время как для линии 278 учитываемые показатели были на уровне контроля или незначительно его превышали. Воздействии положительным полем оказывало увеличение регенерационной способности зародышей и каллусной ткани (на 6%) на уровне контроля в пределах ошибки опыта.

Таким образом, для регенерации пивоваренного ячменя в культуре *in vitro* целесообразно использовать воздействие слабого отрицательного электрического поля, которое стимулирует процесс морфогенеза и регенерации пивоваренного ячменя.

Т а б л и ц а 1

### Влияние времени экспозиции и воздействия электрического поля на морфогенез (сорт Нутанс 278)

Вариант	Количество эмбриогенных каллусов (%) на 10-е сут культивирования	Характеристика каллусов	Количество эмбриогенных каллусов, (%) на 20-е сутки культивирования	Характеристика каллусов
Контроль	58	Светло-жёлтый, рыхлый	62	Светло-жёлтый, рыхлый, иногда белый водянистый
+10 кВм	64	Плотный, узловатый, коричнево-жёлтый	68	Коричнево-жёлтый, водянистый
-10 кВм	73	Плотный, узловатый, коричнево-жёлтый	80	Плотный, узловатый, коричнево-жёлтый, слегка водянистый

**Влияние постоянного электрического поля на процессы регенерации ячменя  
в культуре in vitro**

Вариант	Количество высаженных экплантов, шт.	Регенерация зелёных побегов, %	Среднее количество регенерантов на каллус, шт.
Контроль Нутанс 278	100	36	1,8±0,4
+10 кВм Нутанс 278	125	42	2,4±0,2
-10 кВм Нутанс 278	125	51	2,1±0,2
Контроль Нутанс 553	100	36	1,5±0,1
+10 кВм Нутанс 553	150	42	2,0±0,4
-10 кВм Нутанс 553	150	69	3,6±0,3
Контроль Нутанс 642	150	41	1,9±0,3
+10 кВм Нутанс 642	175	39	1,9±0,2
-10 кВм Нутанс 642	175	61	2,8±0,2

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Бутенко Р.Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре in vitro // В кн.: Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974. С. 67-83. — 2. Деменко В.И., Каменская К.И., Третьяков Н.Н. и др. Электростимуляция роста и развития чёрной смородины в культуре in vitro // Изв. ТСХА. М., 1994. Вып. 2. С. 179-182. — 3. Деменко В.И., Каменская К.И., Третьяков Н.Н. Влияние электростатического поля на рост и развитие плодовых и ягодных растений in vitro // Докл. ТСХА. М., 1995. Вып. 226а. С. 107-110. — 4. Долгих Ю., Китлаев Г., Бутенко Р. Физиологическое действие электрического тока на культуру клеток кукурузы in vitro // Докл. РАН, 1994. Т. 335. № 3. С. 393-395. — 5. Журбицкий З.И., Шидловская И.Л. Влияние электрического поля атмосферы на накопление элементов минерального питания растениями кукурузы, лука, редиса и ячменя // Роль минеральных элементов в обмене веществ и продуктивности растений. М., 1964. С. 286—295. — 6. Караваев Ч.А. Каллусогенез и регенерация различных генотипов пивоваренных сортов ячменя (*Hordeum vulgare*) in vitro. Тезисы док-

ладов IV молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». М., 2004. — 7. Китлаев Г.Б., Диас С., Вера-Рамос Т.Ю. и др. Стимуляция слабым электрическим током регенерации растений в культуре тканей кукурузы // Биотехн., 2001. №5. С. 58-63. — 8. Ковалёв В.М., Калашикова Е.А., Белов Д.В. Применение энергоинформационного поля для повышения морфогенетической активности интактных растений в культуре in vitro // Докл. ТСХА, 1999. Вып. 270. С. 147-154. — 9. Медведев С.С. Электрофизиология растений // СПб., 1998/ — 10. 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. // Сельхоз. Биол., 2004. №1. С. 73-78. — 11. Cho M.J., Jiang W., Lemaux P.G. // Plant Sci., 1998. 138. P. 229-244. — 12. Karp A., Lazzeri P. // Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. University of Bristol, Bristol, 1991. P. 549-571. — 13. Lemaux P.G., Cho S., Zhang S., Bregitzer P. // In I.K. Vasil (ed.) Molecular improvement of cereal crops. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, 1999. P. 255-316.

**SUMMARY**

Research data on electrostatic field influence on various lines of brewing barley variety Nutans in order to increase output of regenerate plants for the following biolistic transformation have been cited in the article.