

УДК 581.143.6:633.111.1

**С.М. Ленивко, Н.П. Ерчак, В.В. Коваленко,
Ю.В. Кирисюк, Е.Г. Кобак**

НОВЫЙ ПОДХОД ПО ОПТИМИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭКСПЛАНТОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

Предлагается новый подход по оптимизации питательных сред для культивирования эксплантов пшеницы мягкой (*Triticum aestivum L.*), включающий применение экологически безопасных водорастворимых кремнийорганических соединений. Отбор оптимальных концентраций синтезированных соединений кремния для составления вариантов питательных сред MS предлагается производить на основе выявления эффективности их влияния на морфофизиологические показатели прорастания семян сортового и линейного материала *Triticum aestivum L.*

Внедрение в традиционный селекционный процесс мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) новых биотехнологий позволяет существенно повысить его эффективность и значительно сократить сроки создания новых высокопродуктивных сортов и форм. Впервые во Франции в 1985 году был получен сорт дигампоидной пшеницы Флорин с использованием клеточных технологий *in vitro*. В течение двух лет сортоиспытаний были показаны его сортовые характеристики, однородность и стабильность. Кроме того, этот сорт превосходил четыре районированных во Франции сорта пшеницы. Урожайность его составляла 107,4 и 104,7 % по сравнению с контролем [1, с. 54–55]. Данные результаты подтверждают возможность улучшения агрономических характеристик возделываемых культур путем получения новых удвоенных гаплоидных сортов методами культуры клеток и тканей. При этом сокращаются сроки создания таких улучшенных сортов, по крайней мере, на четыре года.

Появление технологии рекомбинантных ДНК привело к разработке конкретных методик по переносу генов, улучшающих признаки растений, в частности аминокислотный состав запасных белков, придающих устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, сохраняя при этом другие превосходные качества сорта. Первые трансгенные гербицидоустойчивые фертильные растения пшеницы были получены в 1991 году [2]. Трансгенные технологии, направленные на преобразование зерновых культур, в том числе и пшеницы, становятся в настоящее время ключевым элементом в процессе их сортового улучшения. Проведенные исследования показали, что создание генетически модифицированных сортов является более удачным и коммерчески выгодным, если генетическая трансформация новых генов осуществляется непосредственно в адаптированные к местным условиям сорта пшеницы [3]. Кроме того, успех в этом направлении во многом зависит от разработанных эффективных способов индукции процессов каллусогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro*. Установлено, что у пшеницы эти процессы очень зависимы от генотипа, а элитные сорта редко обладают хорошей отзывчивостью в культуре клеток и тканей [4]. В связи с этим многие авторы изучали отклик на условия культивирования тканевых культур пшеницы генотипов элитных европейских [5], азиатских [6], мексиканских [7], австралийских [8], китайских [9] и бразильских [10] сортов.

К настоящему времени разработаны основные приемы и методы введения в культуру *in vitro* различных эксплантов пшеницы, однако индукция образования эмбриоидогенных каллусов при этом часто остается низкой. Известно, что существует комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает заметное влияние на развитие клеточных и тканевых систем *in vitro*. В свою оче-

редь степень влияния каждого фактора зависит от генотипа. В связи с этим, разрабатывая способы повышения индукции морфогенетических процессов в культуре *in vitro* и регенерации растений пшеницы, необходимо апробировать их на различных генотипах.

Одним из возможных направлений исследований повышения отзывчивости эксплантов пшеницы к условиям культивирования является оптимизация питательных сред путем включения в них биологически активных соединений. Большинство исследований проведенных в этом направлении связано с поиском оптимальных концентраций различных регуляторов роста растений (2,4-дихлофеноксиксусной кислоты, 6-бензиламинопурина, индолил-3-уксусной кислоты, кинетина) и их сочетаний для инициации первичного, эмбрионного каллуса и регенерации. Полученные результаты помогают повысить эффективность названных процессов в культуре *in vitro* пшеницы. Однако немаловажным, но малоисследованным направлением является оптимизация минерального и органического компонентов питательных сред. Разрабатываемый нами новый подход предполагает применение в качестве экзогенной добавки кремнийорганических соединений к стандартной прописи макро-, микросолей, органических добавок и витаминов по Т. Мурасиге и Ф. Скугу [11]. Предлагаемый подход основан на доказанной многими авторами биологической роли кремния как микроэлемента в клетках и тканях растений. В литературе имеются сведения о возможности повышения природной устойчивости растений с помощью соединений кремния к различным абиогенным стрессовым факторам. Так, в работе В.В. Матыченкова экспериментально доказано, что при оптимальном кремниевом питании повышаются всхожесть семян и устойчивость растений к солевой токсичности, нехватке воды, низким температурам, присутствию тяжелых металлов и других загрязняющих веществ. В частности, отсутствие кремния неблагоприятно влияет на всхожесть, рост и урожайность зерновых, в основном риса, а также сахарного тростника, подсолнечника, картофеля, свеклы, моркови, огурцов и томатов [12]. Несомненное участие кремния в патогенезе паразитических болезней подтверждено многими исследователями. Кремний пропитывает и упрочняет ткани растений, снижает потерю воды и замедляет развитие грибковых инфекций [13]. Стимулирующее действие растворимого кремния, вероятно, связано с усилением потребления фосфора и молибдена, а также переносом марганца в растительных тканях. Предполагается, что кремний усиливает фосфорилирование и синтез сахаров, что увеличивает поступление энергии для метаболических процессов и повышение интенсивности роста растений [14; 15]. Активное участие кремния в процессах обмена растений сказывается не только на усилении роста, но и на продуктивности многих культур, в первую очередь злаковых. Злаковые культуры являются кремнефильными. По данным М.Г. Воронкова, содержание общего кремния на абсолютно сухой вес растения *Triticum aestivum* L. составляет от 3,88 до 5,52 %, причем в корнях его доля выше (3,11 %), чем в наземной части растения (0,77–2,41 %) [16, с. 102]. В связи с этим является важным решение проблемы кремниевого питания растений. В ряде стран (США, Канада, Австралия, Финляндия) уже производятся минеральные и органические удобрения, содержащие кремний в количестве от 0,025 до 5 %. Российскими учеными компании «НЭСТ М» было разработано кремниевое удобрение «Силиплант» с содержанием от 0,7 до 7,8 % активного кремния в комплексе с микроэлементами в хелатной форме. Апробация «Силипланта», которая проводится на территории России с 2009 года, показала, что при относительно благоприятных условиях выращивания культур прибавка от его применения составила 10–25 % [17].

Опираясь на результаты предыдущих наших исследований о положительном влиянии соединений кремния на морфофизиологические показатели злаковых растений [18–20], предполагаем, что применение экологически безопасных водорастворимых силлильных соединений может рассматриваться как один из факторов, способствующих индукции морфогенетических процессов и регенерации растений *Triticum aestivum* L.

в условиях *in vitro*. В связи с этим целью настоящего этапа исследований являлась разработка подхода по отбору оптимальных концентраций синтезированных соединений кремния для составления вариантов питательных сред MS на основе выявления эффективности их влияния на морфофизиологические показатели прорастания семян сортового и линейного материала *Triticum aestivum* L.

Для оценки биологической активности новых синтезированных кремнийорганических соединений (Е-2102, Е-2029 (H₂O) и ТГ) проведена серия экспериментов с использованием семи районированных в Республике Беларусь сортов и двух дигамплоидных линий из генетической коллекции гомозиготных линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. БрГУ имени А.С. Пушкина.

Сорт Центос относится к сортам интенсивного типа немецкой селекции, пришедшим на смену в 1995 году сорту озимой пшеницы Мироновская 808.

Сорта озимой пшеницы Легенда и Сюита последней селекции, созданные в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», различаются по зимостойкости и устойчивости к болезням, но обладают ценными и хорошими хлебопекарными качествами.

Сорт Богатка польской селекции фуражного назначения занесен в Государственный реестр Республики Беларусь с 2008 года как сорт озимой пшеницы.

Сорт Дарья белорусской селекции отнесен к группе ценных по качеству зерна сортов яровой пшеницы. С 2006 года включен в Реестр селекционных достижений РФ и получил широкое распространение в Центральном регионе России.

Сорт Банти польской селекции с яровым типом развития менее требователен к интенсификации технологии возделывания, чем сорт Мунк немецкой селекции, внесенный в группу ценных по качеству зерна сортов. Эти сорта районированы в Беларуси с 1998 г.

Отобранные дигамплоидные линии созданы путем культивирования *in vitro* пыльников межсортовых гибридов первого поколения мягкой пшеницы. Дигамплоидная линия Dh 65-32 происходит из F₁ межсортового гибрида Безостая 1 × Красноярская, Dh 67-16 – Безостая 1 × Мироновская 808. Линии Dh 65-32 и Dh 67-16 имеют сходные электрофоретические спектры глиадинов.

Проведен эксперимент по оценке влияния соединения ТГ на лабораторную всхожесть, энергию прорастания, длину зародышевых корешков и ростков семян пяти сортов (Центос, Легенда, Сюита, Богатка, Дарья) и двух дигамплоидных линий Dh 65-32 и Dh 67-16 пшеницы *Triticum aestivum* L. Проращивание семян мягкой пшеницы проводили в растительных между слоями фильтровальной бумаги согласно п. 3.8.2. ГОСТ 12038-84 [21].

Проведен эксперимент по оценке влияния двух силильных соединений Е-2029 (H₂O) и Е-2102 на лабораторную всхожесть и энергию прорастания семян пяти сортов пшеницы (Центос, Легенда, Мунк, Дарья, Банти). Определение всхожести семян проводили по ГОСТ 12038-84 согласно п. 3.8.3 [21]. Проращивание семян проводилось в рулонах с использованием фильтровальной бумаги.

Статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятым методикам биологической статистики согласно П.Ф. Рокицкому.

На примере шести сортов пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. показано, что концентрации 0,01 и 0,001 ммоль/л ТГ проявляют биологическую активность по показателям *энергия прорастания семян* и *лабораторная всхожесть*, увеличивая их значения от 1 до 15 % по сравнению с контролем в зависимости от варианта опыта. Среди четырех сортов озимой мягкой пшеницы наиболее чувствительными к воздействию ТГ оказались сорта Центос и Легенда. Анализ данных эксперимента по оценке влияния соединения ТГ на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян гомозиготного линейного материала показал однотипность ответных реакций по вариантам опыта линий Dh 65-32 и Dh 67-16, имеющих сходные электрофореграммы глиадинов и общего предка.

Установлено, что соединение ТГ в своей максимальной концентрации (0,1 ммоль/л) снижает значения по данным показателям по сравнению с контролем.

Во второй серии экспериментов по оценке влияния силильных соединений Е-2029 и Е-2102 на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян мягкой пшеницы были отобраны наиболее чувствительные озимые сорта Центос, Легенда и яровые сорта Мунк, Дарья, Банти. Стимулирующий эффект был установлен в отношении Е-2029 с концентрацией 0,001 ммоль/л и Е-2102 с концентрациями 0,01 и 0,001 ммоль/л. Генотип сорта Дарья оказался наиболее чувствительным к воздействию указанных кремнийорганических соединений.

В качестве количественного показателя для определения биологической активности синтезированных силильных соединений выбрано определение интенсивности роста семян методом морфофизиологической оценки проростков. Для этого в день определения всхожести семян измеряли длину ростков у 62 проростков, длину наиболее длинного корешка – у 85 проростков, затем подсчитывали число зародышевых корешков и определяли сырую массу ростков и зародышевых корешков для всех измеренных проростков. Результаты исследований показали, что обработка семян пшеницы сортов Дарья, Центос, Легенда, Богатка, Сюита 0,1 ммоль/л водным раствором ТГ уменьшает среднюю длину зародышевых корешков проростков по сравнению с контролем, хотя в большинстве вариантов опыта не тормозит рост ростков. Лучшими оказались концентрации ТГ 0,01 и 0,001 ммоль/л, которые в большинстве вариантов опыта способствовали росту зародышевых корешков, причем концентрация 0,001 ммоль/л оказывала стимулирующий эффект и на рост ростков проростков. Исследование интенсивности роста проростков пяти сортов пшеницы после обработки их семян различными мольными концентрациями веществ Е-2029 и Е-2102 показало, что малые мольные концентрации, как правило, благоприятно влияют на рост ростков. Сырая масса ростков оказалась больше по сравнению с контролем в тех вариантах опыта, в которых семена обрабатывали 0,01 и 0,001 ммоль/л концентрациями соединения Е-2102.

Проанализировав данные экспериментов по исследованию влияния синтезированных кремнийорганических соединений на всхожесть и энергию прорастания семян сортового и линейного материала *Triticum aestivum* L. нами отобраны 0,01 и 0,001 ммоль/л концентрации синтезированных соединений кремния ТГ, Е-2029 и Е-2102 для составления вариантов питательных сред MS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Florin: a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method / J. De Buyser [et. all.] // Plant Breeding. – 1987. – Vol. 98. – P. 53–56.
2. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryogenic callus / V. Vasil [et. all.] // Biotechnology. – 1992. – Vol. 10. – P. 667–674.
3. Jones, H.D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition / H.D. Jones // Journal of Cereal Science. – 2005. – Vol. 41. – P. 137–147.
4. Bhalla, P.L. Wheat transformation – an update of recent progress / P.L. Bhalla, H.H. Ottonhof, M.B. Singh // Euphytica. – 2006. – Vol. 149, № 3. – P. 353–366.
5. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties // G.M. Pastori [et. all.] // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 52. – P. 857–863.
6. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat / W. Li [et. all.] // Plant Science. – 2003. Vol. 164. – P. 1079–1085.

7. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats / S. Fennell [et. all.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1996. – Vol. 92. P. 163–169.
8. Comparison of three selectable markers gene for transformation of wheat by microprojectile bombardment / B. Witrzens [et. all.] // *Australian Journal of Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 25. – P. 39–44.
9. The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system / Z.X. Tang [et. all.] // *Agricultural Science in China*. – 2006. – Vol. 5. – P. 417–424.
10. Callus induction and plant regeneration by Brazilian new elite wheat genotypes / E. Vendruscolo [et. all.] // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. – 2008. – Vol. 8. – P. 195–201.
11. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiology Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
12. Матыченков, В.В. Роль подвижных соединений кремния в растениях и системе почва–растение: автореф. дис. ... док. биол. наук : 24.12.2008 / В.В. Матыченков ; Институт фундаментальных проблем биологии РАН. – Пушкино, 2008. – 34 с.
13. Смолин, Н.В. Влияние регуляторов роста на зараженность растений озимой ржи *Puccinia recondite* и *Blumeria graminis* F. sp. *Secalis* / Н.В. Смолин, А.С. Савельев // *Научный журнал КубГАУ*. – 2007. – № 27(3). – С. 8–23.
14. Кабата-Пендиас, А. Микроэлементы в почвах и растениях: пер. с англ. / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М. : Мир, 1989. – 439 с.
15. Колесников, М. П. Формы кремния в растительном материале и их количественное определение / М.П. Колесников, Б.Д. Абатуров // *Успехи современной биологии*. – 1997. – Т. 117, № 5. – С. 534–547.
16. Воронков, М.Г. Кремний и жизнь. Биохимия, фармакология и токсикология соединений кремния / М.Г. Воронков, Г.И. Зелчан, Э.Я. Лукевиц. – 2-е изд. – Рига : Зинатне, 1978. – 587 с.
17. Попов, Л.Б. Кремний – элемент урожая или чтобы «песок не сыпался» [Электронный ресурс] / Некоммерческое научно-производственное партнерство «Нэст М». – Москва, 2011. – Режим доступа: http://www.nest-m.ru/rubriki/cat_118/pub_208.
18. Ленивко, С.М. Влияние малых мольных концентраций бисилильных пятикоординированных соединений на морфофизиологические показатели трех видов газонных трав / С.М. Ленивко, Ю.В. Кирисюк, Н.П. Ерчак // *Веснік Брэсцкага ўн-та*. – 2010. – № 1. – С. 63–67.
19. Гидрооксалат метилбис(фенилметил)-γ-пиперидинопропилсилана / Н.П. Ерчак [и др.] // *Журнал общей химии*. – 2008. – Т. 78. – Вып. 9. – С. 1580–1581.
20. Коваленко, В.В. Рострегулирующая активность гидрооксалата диметил(2-тиенил)-γ-[(N-метил)-N'-пиперазинопропил]силана / В.В. Коваленко, Н.П. Ерчак // *Веснік Брэсцкага ўніверсітэта*. – 2010. – № 2. – С. 14–17.
21. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : ГОСТ 12038-84. МКС 65.020.20. ОКСТУ 9790. – Введ. 01.07.86. – М. : Межгосударственный стандарт. Группа C09, 1986. – 29 с.

S.M. Lenivko, N.P. Erchak., V.V. Kovalenko, J.V. Kirisjuk, E.G. Kobak. A New Approach to Optimize Culture Medium for Cultivation of Explants of Wheat (*Triticum aestivum* L.)

The authors offer a new approach to optimize culture medium for cultivation of explants of wheat (*Triticum aestivum* L.), which includes the use of ecologically benign water soluble organosilicon compounds. To prepare variants of culture mediums MS it is proposed to select optimal concentrations of the silicon compounds synthesized on the basis of their influence on morphophysiological indicators of sprouting of variety and linear material *Triticum aestivum* L.

Рукапіс паступіў у рэдкалегію 22.10. 2011 г.