

УДК 581.132.8:633.32:581.144

Т. Г. ЯНЧЕВСКАЯ, О. А. КОВАЛЁВА, А. Н. ГРИЦ, О. В. ЛЕМЕЗА

**ДИНАМИКА РОСТА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ
КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE*)
В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ**

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, e-mail: t_yanch@mail.ru

(Поступила в редакцию 27.10.2011)

Введение. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) – одна из наиболее богатых белком многолетних трав, имеющая огромное значение в создании прочной кормовой базы, значительном увеличении почвенного плодородия и экологически чистой системе земледелия. В селекции культур поставлена задача создания сортов, приспособленных к разным почвенно-климатическим условиям, устойчивым к болезням, высокоурожайным, с повышенным содержанием белка, обладающим высокой и устойчивой семенной продуктивностью. Для ее решения особые надежды возлагаются на генную инженерию, которая продолжает направление традиционной селекции по улучшению генотипов полезных растений, но достигает той же цели более эффективным и быстрым путем. Технология создания трансгенных растений основана на переносе генов [1, 2] из различных гетерологичных систем (вирусов, микроорганизмов, животных, человека), поэтому трансгенные растения можно рассматривать как яркий пример преодоления физических, эволюционных и генетических барьеров, изолирующих геномы различных организмов [3]. Для получения трансгенных растений клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) необходимо не только подобрать оптимальную схему агробактериальной трансформации и выбрать эксплант, но и скорректировать условия содержания растений в защищенном грунте: световой режим, минеральное питание и водный режим растений клевера в условиях *ex vitro* – *in vivo*. Показано, что при выращивании клевера на семена большое влияние оказывает минеральное питание, обеспечивающее необходимыми макро- и микроэлементами [4].

Согласно многочисленным исследованиям [5–8], у растений клевера к моменту образования первого тройчатого листа возникает потребность в дополнительном питании азотом, в фазе 7–10 настоящих листьев – фосфором, кальцием, магнием, калием, бором, марганцем и др. Кроме того, достаточное количество микроэлементов повышает устойчивость клевера к болезням [9].

Растения, обладая строгим набором генетически детерминированных признаков, имеют определенные адаптивные возможности к меняющимся условиям внешней среды. Эта способность растений выработалась в процессе эволюции в фитоценозах или селекционной работы человека и позволяет даже в неблагоприятных условиях в той или иной мере реализовать продукционный потенциал. Современные физиология и экология растений располагают многочисленными эмпирическими данными о зависимости показателей развития и продуктивности растений от обеспеченности их почвенными и климатическими ресурсами в разные периоды вегетации. На основе этих данных найдены эмпирические связи между интегральными характеристиками окружающей среды и конечными показателями структуры и продуктивности агрофитоценозов.

Ранее с нашим участием была разработана имитационная динамическая модель оптимизации минерального питания сельскохозяйственных агроценозов с учетом тепловлагообеспеченности сезона [10, 11]. На основании модели была создана компьютерная программа, позволяю-

щая рассчитывать необходимую дозу органических и минеральных удобрений под планируемый урожай культуры в условиях определенного паспорта поля и с учетом динамики элементов питания. Эти работы имели не только строго фундаментальное научное значение для развития физиологии минерального питания, но и нашли свое прикладное применение и стали использоваться в ряде хозяйств Беларуси.

Для разработки теоретических подходов к оптимизации роста и развития растений в изменяющихся условиях природной среды необходимо иметь модельную систему, позволяющую изучать динамику процессов роста и физиологических ответов растений, отражающих адаптационный потенциал растения. Надежные многомерные зависимости морфологических параметров растений и показателей качества полученного урожая от дозы и соотношения биогенных элементов в питательном субстрате (топографические характеристики продукционного процесса) могут быть получены с помощью многофакторного вегетационного или полевого эксперимента. В своей работе на основе результатов собственных многофакторных лабораторных экспериментов мы реализовали метод систематических вариантов Омеса и системы сбалансированного минерального питания Ринькиса [10, 11] на IBM PC и **расширили их возможности, разработав компьютерную модель минерального питания растений**. На основании модели созданы ионообменные субстраты многоразового использования нового поколения (ТРИОНА® и Трионит®), сбалансированные по минеральному составу для различных таксономических групп [10, 11]. В контролируемых условиях проведены исследования адаптации растений клевера при смене условий выращивания – переносе культуры из *in vitro* в условия *in vivo* и *ex vitro*.

Цель настоящей работы – изучить особенности роста и развития трансформированных растений клевера лугового и их адаптации в различных условиях минерального питания.

Материалы и методы исследования. В работе использованы трансгенные растения клевера лугового ди- и тетраплоидных сортов: Янтарный, Витебчанин и Цудоуны белорусской селекции. Для трансформации использовали двухдневную культуру *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущую модельный вектор на основе pGreen 0229 со вставкой 35S-GUS (маркерные гены BAR, GUS). Трансформированные *in planta* и нетрансформированные растения клевера лугового сортов Витебчанин, Янтарный и Цудоуны были высажены в пластиковые контейнеры с ионообменным субстратом ТРИОНА® (опыт) и почвогрунтом «Двина» (контроль, pH 6,4), соответствующим естественным условиям выращивания культуры клевера (рис. 1). В почвогрунт и субстрат дополнительно вносили «Микоплант», представляющий собой комплексный биопрепарат, содержащий споры грибов Глобус (Германия).

Субстрат ТРИОНА® [10] представляет собой композицию, состоящую из ионообменных синтетических полимеров (катионит Тулсион Т-42, анионит АН-2Ф в объемном соотношении 60:40), природного катионита (Сокирницкий цеолит) и инертного наполнителя (перлит) в объемном соотношении 30 (синтетические ионообменники): 70 (природный цеолит): 200 (перлит), насыщенные по оптимуму для растений клевера и предназначенные для проведения полной



Рис. 1. Внешний вид контейнеров с развивающимися сеянцами сортов клевера на разных ионообменных субстратах и в торфогрунте

вегетации и получения семян. Субстрат ТРИОНА® готовится механическим смешиванием в указанных выше соотношениях в соответствии с регламентом насыщения. Трансформированные и контрольные растения клевера лугового выращивали на биотехнических комплексах БТК-1 [11] в контролируемых условиях с искусственным освещением (лампы ДНаЗ-400 при $\lambda_{\max} = 594\text{--}600$ нм, освещенность 24000 лк, фотопериод 16/8 ч), при влажности воздуха (75–80 %) и температуре: днем – 20 ± 2 °С, ночью – 17 ± 2 °С [11]. Полив осуществлялся дистиллированной водой. Морфологический анализ растений проводили согласно методикам, описанным в [7]. В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее (M), стандартную ошибку среднего (m), достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($P = 0,05$). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ MS Excel 2003, STATISTICA 6.0 и статистических методов, принятых в области биологических исследований [12].

Результаты и их обсуждение. Наблюдение за ростом и развитием трансформантов клевера лугового сортов Цудоуны, Янтарный и Витебчанин при различном минеральном питании показало, что динамика их развития на ионообменном субстрате ТРИОНА® проходит интенсивнее, чем в традиционных условиях почвогрунта (табл. 1–5).

Т а б л и ц а 1. Морфологические характеристики трансформантов

Возраст, сутки	Сорт	Вариант опыта	Длина стебля, см	Длина корней, мм
9-е	Цудоуны	Почвогрунт	$2,4 \pm 1,1$	$3,1 \pm 0,5$
		ТРИОНА	$4,1 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,5$
	Янтарный	Почвогрунт	$3,2 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$
		ТРИОНА	$4,0 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,2$
14-е	Цудоуны	Почвогрунт	$3,9 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,6$
		ТРИОНА	$4,6 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,8$
	Янтарный	Почвогрунт	$4,1 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,3$
		ТРИОНА	$4,6 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$

Т а б л и ц а 2. Морфологические характеристики трансформантов (сорт Янтарный, возраст 30 сут)

Вариант опыта	Высота, см	Масса надземной части, г	Масса корней, г	Длина корней, см	Облиственность
ТРИОНА	$9,1 \pm 1,1$	$0,15 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,04$	$10,36 \pm 1,7$	1,42
Почвогрунт	$8,9 \pm 1,3$	$0,13 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$	$11,4 \pm 4,5$	1,29

Анализ сырой массы растений клевера лугового сортов Цудоуны и Витебчанин также показал преобладание данного показателя у растений, выращенных на субстрате ТРИОНА® (табл.3, 6).

Т а б л и ц а 3. Анализ сырой массы растений клевера лугового сорта Цудоуны (возраст 90 сут)

Вариант опыта	Масса листьев, г	Масса стеблей, г	Масса корней, г	Масса соцветий, г
ТРИОНА	$5,84 \pm 1,1$	$10,38 \pm 1,8$	$2,71 \pm 0,3$	$5,36 \pm 1,2$
Почвогрунт	$2,60 \pm 0,6$	$4,75 \pm 0,9$	$1,76 \pm 0,1$	$10,78 \pm 2,5$

Среднее число стеблей в кусте у трансформированных растений клевера сорта Цудоуны на субстрате больше в 1,4 раза, чем у тех же растений, выращенных на почвогрунте (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Биометрический анализ трансформантов (сорта Цудоуны, возраст 90 сут)

Вариант опыта	Среднее число стеблей в кусте	Среднее число на стебле			Среднее число на кусте	
		междоузлий	соцветий	листьев	соцветий	листьев
ТРИОНА®	$7,1 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	44 ± 5
Почвогрунт	$5,2 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	25 ± 3

Среднее число соцветий и листьев у нетрансформированных контрольных растений увеличилось в 1,25–1,5 раза, а у трансформированных в 1,8 раза больше при выращивании на субстрате ТРИОНА® (табл. 4).

Учитывая, что поглощение и усвоение элементов питания растениями зависит от значений pH корнеобитаемой среды, были проведены эксперименты по выращиванию растений на почвогрунте «Двина» и субстрате ТРИОНА® с различными значениями pH. Результаты отражены в табл. 5–7.

Т а б л и ц а 5. Морфометрический анализ растений клевера сорта Витебчанин (возраст 30 сут)

Вариант опыта	Высота растений, см	Длина корней, см	Количество листьев, шт.	Количество стеблей, шт.
Почвогрунт, нетрансформированные растения	8,83 ± 0,32	16,6 ± 3,63	4,0 ± 1,13	5,66 ± 0,65
ТРИОНА pH 4,0, нетрансформированные растения	10,3 ± 1,3	20,0 ± 4,7	5,0 ± 1,12	6,0 ± 1,1
ТРИОНА pH 5,9, нетрансформированные растения	11,33 ± 2,6	24,3 ± 11,3	4,6 ± 1,72	5,6 ± 1,3
Почвогрунт, трансформанты	8,83 ± 3,2	13,5 ± 6,85	3,3 ± 1,72	4,3 ± 1,3
ТРИОНА pH 4,0, трансформанты	9,0 ± 1,95	14,3 ± 7,7	4,0 ± 1,1	5,3 ± 0,65
ТРИОНА pH 5,9, трансформанты	9,66 ± 0,65	19,3 ± 2,84	4,3 ± 1,7	6,0 ± 1,1

Морфометрический анализ растений клевера лугового сорта Витебчанин в условиях различного минерального питания позволил выявить наиболее интенсивно развивающиеся морфотипы на ионообменном субстрате ТРИОНА® с pH 5,9 по сравнению с условиями субстрата при pH 4,0 и почвогрунта при pH 6,4 (табл. 5, рис. 2).



Рис. 2. Внешний вид трансформантов сорта Витебчанин на почвогрунте (а) и ионообменном субстрате ТРИОНА с pH 5,9 (б), 4,0 (в)

Т а б л и ц а 6. Биометрический анализ сырой массы растений клевера лугового сорта Витебчанин (возраст 30 сут)

Вариант опыта	Сырая масса листьев, г	Сырая масса стеблей, г	Сырая масса корней, г
Почвогрунт, нетрансформированные растения	0,06 ± 0,005	0,098 ± 0,020	0,063 ± 0,02
ТРИОНА® pH 4,0, нетрансформированные растения	0,09 ± 0,003	0,145 ± 0,020	0,126 ± 0,06
ТРИОНА® pH 5,9, нетрансформированные растения	0,08 ± 0,010	0,130 ± 0,040	0,190 ± 0,08
Почвогрунт, трансформанты	0,052 ± 0,005	0,080 ± 0,001	0,046 ± 0,01
ТРИОНА® pH 4,0, трансформанты	0,090 ± 0,034	0,140 ± 0,040	0,100 ± 0,01
ТРИОНА® pH 5,9, трансформанты	0,097 ± 0,034	0,170 ± 0,080	0,130 ± 0,05

Биологический урожай по сухой массе (содержание сухого вещества в листьях, стеблях и корнях) растений, выращенных в различных условиях минерального питания, представлен в табл. 7.

Т а б л и ц а 7. Биометрический анализ сухой массы растений клевера лугового сорта Витебчанин (возраст 30 сут)

Вариант опыта	Сухая масса корней, г	Сухая масса стебля, г	Сухая масса листьев, г
Почвогрунт, нетрансформированные растения	0,0189 ± 0,001	0,0305 ± 0,002	0,0076 ± 0,003
ТРИОНА® pH 4,0, нетрансформированные растения	0,0396 ± 0,003	0,0497 ± 0,003	0,0126 ± 0,002
ТРИОНА® pH 5,9, нетрансформированные растения	0,0440 ± 0,002	0,0310 ± 0,002	0,0075 ± 0,006
Почвогрунт, трансформанты	0,0161 ± 0,001	0,0265 ± 0,001	0,0060 ± 0,003
ТРИОНА® pH 4,0, трансформанты	0,0289 ± 0,002	0,0443 ± 0,002	0,0100 ± 0,002
ТРИОНА® pH 5,9, трансформанты	0,0413 ± 0,001	0,0561 ± 0,003	0,0129 ± 0,008

Как видно из табл. 7, содержание сухого вещества в листьях, стеблях и корнях преобладает у растений клевера лугового сорта Витебчанин, выращиваемых на субстрате ТРИОНА® с pH 4,0 и 5,9. Особенно заметно увеличение сухой массы стеблей, корней и листьев у трансформированных растений на субстрате ТРИОНА® с pH 5,9.

Заключение. Структурный анализ растений клевера лугового выявил существенные различия в характере и динамике роста и развития трансформированных растений в различных условиях минерального питания и значениях кислотности корнеобитаемой среды. С помощью морфологических и биометрических методов показано, что к 30 сут растения изученных сортов клевера лугового белорусской селекции – Витебчанин, Янтарный и Цудоуны – имели более развитую корневую систему, большую высоту и располагали большим числом стеблей, которые характеризовались повышением в 1,5–2,0 раза количества междоузлий и листьев по сравнению с растениями, выращенными на торфогрунте «Двина». Выявленные различия в динамике роста и развития трансформированных и нетрансформированных растений клевера лугового изученных сортов при различных условиях минерального питания и значений кислотности могут быть использованы для селекции растений на продуктивность зеленой массы.

Литература

1. *Michielse C. B.* // Molecular Genetics and Genomics. 2004. Vol. 271. P. 638–638.
2. *Michielse C. B.* // Fungal Genetics and Biology. 2004. Vol. 41. P. 571–578.
3. *Miki B., McHugh Y.* // J. Biotechnology. 2004. Vol. 107. P. 193–232.
4. *Murakami T.* // Mol. And Gen. Genet. 1986. Vol. 205. P. 42–50.
5. *Drury C. F., Drury C. F., Tan C. et al.* // Agron. J. 1999. Vol. 91. P. 101–108.
6. *Smith D., Smith R. R.* // Agron. J. 1977. Vol. 69. P. 45–48.
7. *Новоселова А. С.* Селекция и семеноводство клевера. М., 1986.
8. *Gil J. L., Fick W. H.* // Agron. J. 2001. Vol. 93. P. 902–910.
9. *Stout W. L., Sidle R. C., Hern J. L., Bennett O. L.* // Agron. J. 1979. Vol. 71. P. 662–665.
10. *Янчевская Т. Г., Бобров В. А., Ольшаникова А. Л.* Способ круглогодичного получения мини-клубней картофеля в защищенном грунте. Патент РБ № 5891: Заявл. 10.10.2003.
11. *Янчевская Т. Г., Бобров В. А., Пешков С. А.* Устройство для круглогодичного выращивания безвирусных мини-клубней и рассады картофеля. Патент РБ № 2579: Заявл. 25.08. 2005.
12. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Мн., 1973. С. 28–50.

T. G. YANCHEVSKAYA, O. A. KOVALYOVA, A. N. GRITZ, O. V. LEMEZA

DYNAMICS OF GROWTH OF THE TRANSFORMED PLANTS OF THE CLOVER MEADOW (TRIFOLIUM PRATENSE) IN VARIOUS CONDITIONS OF A MINERAL FOOD

Summary

The structural analysis of plants of a clover meadow has revealed essential distinctions in character and dynamics of growth and development of the transformed plants on marker to genes BAR and GUS, bearing a modeling vector on a basis pGreen 0229 with an insert 35S-GUS concerning not transformed control plants in the conditions of a various mineral food and values of acidity root living medium environments. The obtained data concerning dynamics of growth and development of the transformed and not transformed plants of a clover meadow the studied grades under various conditions of a mineral food for selection of plants on efficiency of green weight can be used.