

## ЭФФЕКТЫ 24–ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. В КУЛЬТУРУ IN VITRO

**Е.П. ГЛЕБ, Е.С. ГУК, О.А. КУДРЯШОВА, А.А. ВОЛОТОВИЧ**

*Полесский государственный университет,*

*г. Пинск, Республика Беларусь*

**Введение.** Брассиностероиды являются перспективной группой гормонов растений. По химической природе – это производные оксистероидов с лактонной группой в кольце В. Внутриклеточный путь передачи сигнала и регуляция экспрессии генов начинается со связывания молекул брассиностероида с цитоплазматическим рецептором растительных клеток, представляющим собой BRI1–BAK1–киназный комплекс. В цитоплазме запускается каскад реакций фосфорилирования, в результате которого происходит ингибирование активности BIN2–киназы, с одной стороны, и накопление активных, находящихся в дефосфорилированном состоянии, факторов транскрипции BES1 и BZR1, с другой. В ядре растительных клеток факторы транскрипции распознают нуклеотидные ДНК–последовательности промоторной области генов–мишеней, и после связывания с ними запускают экспрессию этих генов. Брассиностероиды стимулируют различные физиологические изменения в растительных клетках, включающие изменение мембранного потенциала, фотосинтетической и ферментной активности, баланса эндогенных фитогормонов. В действии брассиностероидов на рост и развитие растений отмечены также эффекты синергизма с другими фитогормонами, в частности, с ауксинами. Регуляция роста и дифференцировки растительных клеток, опосредованная брассиностероидами, приводит к усилению реакции геотропизма, удлинению стебля, ускорению развития листа и роста пыльцевой трубки, дифференциации ксилемы, повышению жизнеспособности пыльцы, задерживанию старения листьев, и к повышению устойчивости растений к стрессу [1].

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный, экономически значимый вид для промышленного культивирования в условиях нашей страны, особенно в южной агроклиматической зоне Беларуси [2].

Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* является экономически выгодным [3, 4], и рассматривается как один из основных промежуточных этапов комплексной, современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах [5]. В настоящее время на базе НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» разработан проект технологического регламента комплексного производства посадочного материала сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. в промышленных объемах по ускоренной технологии, с использованием метода клонального микроразмножения растений *in vitro* на начальном этапе производства [5]. Результаты научных исследований, проведенных на базе НИЛ клеточных технологий в растениеводстве ПолесГУ в 2009–2011 гг., позволили существенно изменить традиционные [3, 4] в Республике Беларусь подходы к клональному микроразмножению растений рода *Vaccinium* L., в частности, усовершенствовать составы питательных сред, и сделать процесс производства посадочного материала более технологичным (заявка № А20110076 от 20.01.2011 года о выдаче патента Республики Беларусь на изобретение) [6].

В нашей статье впервые приведены результаты исследований регенерационной активности эксплантов голубики высокой *V. corymbosum* L. на модифицированной по составу агаризованной, питательной среде на макро– и микро– солевой основе WPM, дополненной 24–эпибрассинолидом, а также проведен сравнительный анализ результатов исследований регенерационной активности эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных питательных, агаризованных средах с органическими соединениями и на макро–, микро– солевой основе WPM и Андерсона, дополнительно содержащие гормоны 24–эпибрассинолид (ЭБ), зеатин и 6– $\gamma$ , $\gamma$ –диметилаллиламино–пурин (2iP).

**Методика и объекты исследования.** Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» в 2010–2011 гг. В качестве объекта исследований использовали перспективные сорта голубики высокой *V. corymbosum* L. – Нортланд, Патриот, Блюкроп и Цукер Траубе.

В качестве первичных эксплантов для стерилизации и введения в культуру *in vitro* использовали недревесневшие, верхушечные фрагменты стебля длиной 15 мм с 1–2 почками. Общее количество фрагментов составило 872 экспланта. В качестве стерилизующего агента по модифицированной методике введения растений *V. corymbosum* L. в культуру *in vitro* использовали 7,5% раствор гипохлорита натрия, при продолжительности экспозиции эксплантов 25 минут. После стерилизации и отмывки экспланты сортов Нортланд, Патриот, Блюкроп высаживали в пробирки диаметром 22 мм на питательные агаризованные среды на макро– и микро– солевой основе WPM, различающиеся по содержанию 24–эпибрасинолида (0,00 мг/л – контроль; 0,25 мг/л; 0,50 мг/л; 0,75 мг/л).

Экспланты сорта Цукер Траубе после стерилизации и отмывки в дистиллированной воде высаживали в пробирки диаметром 22 мм на 4 различающихся по составу типа питательных агаризованных сред: тип 1 – макро–, микро– солевая основа WPM с 15 мг/л 2iP и 0,75 мг/л ЭБ; тип 2 – макро–, микро– солевая основа WPM с 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л ЭБ; тип 3 – макро–, микро– солевая основа Андерсона с 15 мг/л 2iP и 0,75 мг/л ЭБ; тип 4 – макро–, микро– солевая основа Андерсона с 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л ЭБ.

Учет количества стерильных эксплантов, и стерильных активно регенерирующих эксплантов проводили через каждые 7 дней в течение двух месяцев культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, освещенности 4000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [7], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [8].

**Результаты и их обсуждение.** Выход стерильных эксплантов голубики высокой *in vitro* после стерилизации и высадки на питательные среды сортов Патриот, Нортланд, Блюкроп представлены в таблице 1.

В соответствии с полученными данными, присутствие в составе модифицированной, агаризованной, питательной среды 24–эпибрасинолида в концентрации 0,50 мг/л позволяет увеличить количество активно регенерирующих стерильных эксплантов исследуемых сортов на 3,8–65,0% (в 1,2–4,8 раза), в зависимости от генотипа (сорта).

В дальнейшем представляло интерес изучить возможные эффекты разных концентраций 24–эпибрасинолида на регенерантах *in vitro*. Так, в экспериментах с эксплантами сорта Блюкроп установлено повышение количества активно регенерирующих стерильных эксплантов с увеличением концентрации 24–эпибрасинолида в составе агаризованной питательной среды (таблица 1).

Таблица 1 – Выход стерильных эксплантов голубики высокой *in vitro* через 8 недель после стерилизации и высадки на питательные среды

Сорт	Вариант опыта	Общее количество ПЭ, шт	Количество стерильных ПЭ, %	Количество активно регенерирующих стерильных ПЭ, %
Патриот	1 (контроль)	161	58,0±16,0	13,5±4,5
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	132	<b>74,7±18,2</b>	<b>25,8±0,1</b>
Нортланд	1 (контроль)	48	68,0	17,0
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	28	<b>100,0</b>	<b>82,0</b>
Блюкроп (от 23.09.10)	1 (контроль)	88	37,7	22,4
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	91	<b>64,8</b>	<b>26,2</b>
Блюкроп (от 14.10.10)	1 (контроль)	57	33,4	15,7
	2 (0,25 мг/л 24–ЭБ)	43	<b>25,0</b>	<b>16,3</b>
	3 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	44	<b>25,6</b>	<b>20,5</b>
	4 (0,75 мг/л 24–ЭБ)	58	<b>46,6</b>	<b>34,5</b>

Примечание – Данные для сорта Патриот представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. ПЭ – первичные экспланты. ЭБ – 24–эпибрасинолид

При этом присутствие 24–эпибрасинолида в концентрациях 0,25, 0,50 и 0,75 мг/л увеличивало выход активно регенерирующих стерильных эксплантов сорта Блюкроп на 0,6 % (в 1,1 раза), 4,8% (в 1,3 раза) и 18,8% (в 2,2 раза) соответственно. Известно, что брассиностероиды ускоряют синтез этилена на этапе между S–аденозилметионином и 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислотой [1]. Этилен стимулирует синтез АБК, которая ускоряет старение клеток, тормозит биохимические

процессы, являясь антагонистом ауксинов, цитокининов и гиббереллинов. При стрессах повышение концентрации этилена играет защитную роль. Стрессовый этилен индуцирует синтез защитных фитоалексинов и фермента хитиназы, разрушающего клеточные стенки грибов (в том числе, патогенных). Возможно, именно с подобным сложным, опосредованным эффектом brassinosteroidов, связана эффективность применения ЭБ на этапе инициации побегообразования у регенерантов сортовой голубики высокой при асептическом введении в культуру *in vitro*, выражающаяся в достоверном увеличении количества стерильных, активно регенерирующих эксплантов.

В дальнейшем был поставлен эксперимент с применением максимальной (0,75 мг/л) из изученных концентраций 24-эпибрассинолида в разных по микро-макро- солевого составу агаризованных, питательных сред для инициации побегообразования у эксплантов сорта Цукер Траубе при их введении в культуру *in vitro*. Кроме того среды различались по составу цитокининов.

Результаты исследований регенерационной активности эксплантов сорта Цукер Траубе *in vitro* на 4 типах модифицированных, агаризованных, питательных сред приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Выход стерильных активно регенерирующих *in vitro* эксплантов сорта Цукер траубе на модифицированных питательных средах

Тип среды	Общее количество первичных эксплантов шт.	Количество стерильных эксплантов, %	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %
WPM+15мг/л 2iP+0,75 мг/л ЭБ	13	76,9	7,65
WPM+1,0 мг/л зеатина + 0,75 мг/л ЭБ	44	77,3	6,87
Андерсона+15мг/л 2iP+0,75 мг/л ЭБ	34	64,7	5,8
<b>Андерсона+1,0 мг/л зеатина+0,75 мг/л ЭБ</b>	<b>31</b>	<b>70,96</b>	<b>25,8</b>

Установлено повышение в 3,4–4,5 раза выхода стерильных эксплантов на макро-, микро- солевой основе среды Андерсона с 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л ЭБ, по сравнению с другими анализируемыми составами сред.

Следует также отметить, что во всех изученных вариантах с применением 24-эпибрассинолида, после пассажа регенеранты сохраняли не только стерильность, но и способность к активному побегообразованию *in vitro*. Некоторый спад активности побегообразования начинал проявляться только после 4–5 пассажей. В данном случае 24-эпибрассинолид можно рекомендовать и для стабилизации растений сортовой голубики высокой в культуре *in vitro*.

Таким образом, присутствие в составе агаризованной, питательной среды 24-эпибрассинолида приводит к увеличению количества активно регенерирующих стерильных эксплантов всех исследуемых сортов, что существенно снижает расход дорогостоящих компонентов питательной агаризованной среды и себестоимость размножаемого *in vitro* посадочного материала сортовой голубики высокой. Кроме того, сокращаются сроки введения (теоретически, любого) сорта голубики высокой в культуру *in vitro*.

**Выводы.** В присутствии 0,5 мг/л 24-эпибрассинолида в составе агаризованной, питательной среды достоверно в 1,2–4,8 раза увеличивается количество активно регенерирующих стерильных эксплантов сортов Патриот, Нортланд, Блюкроп.

Установлено увеличение в 1,1–2,2 раза количества активно регенерирующих стерильных эксплантов сорта Блюкроп, с ростом концентрации 24-эпибрассинолида в пределах 0,25–0,75 мг/л соответственно.

Применение 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида в сочетании с 1 мг/л зеатина в составе среды Андерсона привело к увеличению выхода стерильных, активно регенерирующих эксплантов сорта Цукер Траубе в 3,4–4,5 раз, по сравнению с другими исследуемыми типами агаризованных, питательных сред, различающихся по компонентному составу.

В целом, результаты исследований указывают на то, что относительно высокие концентрации 24-эпибрассинолида, находящиеся в диапазоне 0,50–0,75 мг/л, рекомендуется использовать в составе агаризованных, питательных сред для индукции побегообразования при введении сортовой голубики высокой в культуру *in vitro*. При этом существенно увеличивается количество стериль-

ных, активно регенерирующих эксплантов сортовой голубики, сохраняющих регенерационную активность после пассажа.

Авторы выражают благодарность заведующему лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, член-корреспонденту НАН Беларуси, д.х.н., профессору Владимиру Александровичу Хрипачу за предоставленный 24-эпибрасинолид.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hayat, S. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / S. Hayat, A. Ahmad. – 2010. – 462 p.
2. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова [и др.]. – Мн., 2007. – 442 с.
3. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Мн., 1996. – 246 с.
4. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микрклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // Плодоводство. – 2007. – Т. 19. – С. 209–216.
5. Волотович, А.А. Результаты деятельности НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» как модель развития прикладной биотехнологии на базе ВУЗа // Материалы V междунар. науч.–практ. конф. «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы», Пинск, 28–29 апреля 2011 г. Пинск: ПолесГУ, 2011. Ч. I. С. 286–288.
6. Глеб, Е.П. Усиление регенерационной активности голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *In vitro* в присутствии 24-эпибрасинолида / Е.П. Глеб [и др.] // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы V международной молодежной науч.–практ. конференции. – Пинск, 2011. – Ч. III. – С. 227–229.
7. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.
8. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб, 2001. – 650 с.

### 24-EPIBRASSINOLIDE EFFECTS AT THE STAGE OF IN VITRO INTRODUCTION OF THE HIGH-BUSH BLUEBERRY VACCINIUM CORYMBOSUM L.

*H.P. HLEB, E.S. GUK, O.A. KUDRYASHOVA, A.A. VOLOTOVICH*

#### *Summary*

The results of the comparative analysis of high-bush blueberry explants regenerative activity on WPM and Anderson modified nutrient mediums are resulted at *in vitro* introduction. The method of *in vitro* introduction and stabilization of almost any cultivar of high-bush blueberry *V. corymbosum* L. is offered in the presence of 24-epibrassinolide of 0.25–0.75 mg/l concentration.

© Глеб Е.П., Гук Е.С., Кудряшова О.А., Волотович А.А.

*Поступила в редакцию 21 сентября 2012г.*