

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ
МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ

*Е.П. Глеб, Е.С. Гук, студентки биотехнологического факультета
УО «Полесский государственный университет»*

*Научные руководители – А.А. Волотович, к.б.н., О.А. Кудряшова, научный сотрудник УО
«Полесский государственный университет»*

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный, экономически значимый вид для промышленного культивирования в условиях нашей страны, особенно в южной агроклиматической зоне Беларуси [1]. Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* является экономически выгодным [2, 3], и рассматривается как один из основных промежуточных этапов комплексной, современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах [4].

Клональное микроразмножение растений *in vitro* возможно только после получения стерильных, активно регенерирующих эксплантов. Для повышения генетической стабильности размножаемых *in vitro* регенерантов, активируют аксиллярные меристемы растений [2]. После изолирования и стерилизации первичные экспланты размещают на стерильной, питательной, агаризованной среде, содержащей разные фитогормоны (как правило, цитокинины и ауксины) в оптимальном соотношении для инициации побегообразования *in vitro*. В случае голубики высокой на данном этапе используют среду на макро- и микро- солевой основе WPM [5] с добавлением 15 мг/л 6-(γ,γ -диметил-аллил-амино)-пурина и 4 мг/л индолилуксусной кислоты [2, 3].

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 [6].



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 [7]. Результаты научных исследований, проведенных на базе НИЛ клеточных технологий в растениеводстве ПолесГУ в 2009-2011гг., позволили существенно изменить традиционные [2, 3] 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 [8].

Целью настоящей работы является сравнительный анализ эффективности стандартных и модифицированных методов введения и стабилизации сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. в культуре *in vitro*, с целью выявления метода гарантированного введения и стабилизации *in vitro* сортовой голубики высокой.

Результаты первых введений сортовой голубики высокой по стандартным методам [1] представлены в таблице 1. Следует отметить часто низкий выход стерильных эксплантов в пределах 3-73%, а также в подавляющем большинстве случаев исключительно низкий выход активно регенерирующих, стерильных эксплантов (0-25%).

Таблица 1 – Выход стерильных эксплантов на питательной, агаризованной среде с органическими соединениями и на микро-, макро-солевой основе WPM, 2009-2010гг.

Сорт	Общее количество эксплантов	Количество стерильных эксплантов <i>in vitro</i> %	Количество активно регенерирующих эксплантов, пригодных для пассажа, %
Блюждей	146	33,56	25,34
Торо	34	2,94	0,00
Блюголд	80	18,75	5,00
Нельсон	160	28,75	6,88
Дарроу	319	28,21	3,76
Чандлер	45	15,56	2,22
Патриот	70	8,57	8,57
Нортланд	81	39,50	8,64
Блюкроп	265	57,73	9,06
Эрлиблю	79	58,23	5,06
Джерси	266	46,24	4,89
Легаси	30	73,00	13,00
Герберт	76	67,10	0,00
Конкорд	286	60,49	12,94
Стенли	100	72,00	5,00

Результаты введения и стабилизации сортовой голубики высокой на модифицированных нами по составу питательных, агаризованных средах приведены в таблицах 2–4. Следует отметить значительное увеличение выхода как стерильных эксплантов (25-100%), так и активно регенерирующих, стерильных эксплантов (6-73%).

СЕКЦІЯ 1

«Технічні інновації та практика в управлінні якістю вищої освіти» «Науково-технічний прогрес у розвитку вищої освіти України»»



Таблиця 2 – Выход стерильных, активно регенерирующих in vitro эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных по составу питательных средах, 2010-2011гг.

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	74,7±18,2	25,8±0,1
Нортланд	1 (контроль)	48	68,0	17,0
	2 (0,50 мг/л 24-ЭБ)	28	100,0	82,0
Блюкроп (от 23.09.10)	1 (контроль)	88	37,7	22,4
	2 (0,50 мг/л 24-ЭБ)	91	64,8	26,2
Блюкроп (от 14.10.10)	1 (контроль)	57	33,4	15,7
	2 (0,25 мг/л 24-ЭБ)	43	25,0	16,3
	3 (0,50 мг/л 24-ЭБ)	44	25,6	20,5
	4 (0,75 мг/л 24-ЭБ)	58	46,6	34,5

Примечание. Данные для сорта Патриот представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка.

Таблиця 3 – Выход стерильных, активно регенерирующих in vitro эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных по составу питательных средах, 2011гг.

Сорт	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %	
	WPM _{ЭБ 0,75}	Андерсона _{ЭБ 0,75}
Река	33,30	71,45
Элизабет	9,09	54,54
Денисблю	62,50	72,73
	40,00	61,54
Дюк	-	71,43
Нельсон	-	41,66
Блюголд	-	65,52
Эрлиблю	-	50,00

Таблиця 4 – Выход стерильных, активно регенерирующих in vitro эксплантов сорта Цукертраубе голубики высокой на модифицированных по составу питательных средах, 2011гг.

Параметры	WPM		Андерсона	
	2iP ₁₅ ЭБ _{0,75}	Зеатин ₁ ЭБ _{0,75}	2iP ₁₅ ЭБ _{0,75}	Зеатин ₁ ЭБ _{0,75}
Количество стерильных эксплантов, %	76,90	77,30	64,70	70,96
Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %	7,65	6,87	5,80	25,80



В среднем, следуя классическому методу введения и стабилизации сортовой голубики высокой *in vitro*, количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов на выходе составляет 7,4 % (по данным таблицы 1).

Следуя предложенным нами методам введения и стабилизации сортовой голубики высокой *in vitro*, количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов на выходе, в среднем, составляет 36,7 % (по данным таблиц 2 – 4). Причем все используемые в исследованиях сорта голубики высокой были введены и стабилизированы *in vitro*.

Выход стерильных эксплантов голубики высокой *in vitro* после стерилизации и высадки на питательные среды сортов Патриот, Нортланд, Блюкроп представлены в таблице 2. В соответствии с полученными данными, присутствие в составе модифицированной, агаризованной, питательной среды 24-эпибрассинолида 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-эпибрассинолида на регенерантах *in vitro*. Так, в экспериментах с эксплантами сорта Блюкроп установлено повышение количества активно регенерирующих стерильных эксплантов с увеличением концентрации 24-эпибрассинолида в составе агаризованной питательной среды (таблица 2). При этом присутствие 24-эпибрассинолида 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 [6]. 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 брассиностероидов, 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.

Согласно полученным данным (таблица 3), культивирование эксплантов на модифицированной питательной, агаризованной среде Андерсона приводит к выходу, в среднем, $65,07 \pm 4,31\%$ стерильных, активно регенерирующих *in vitro* эксплантов. Этот показатель превышает соответствующий показатель для эксплантов на модифицированной питательной, агаризованной среде WPM в 1,8 раза ($36,22 \pm 10,99\%$). Все без исключений, вторичные, стерильные экспланты, состоящие не менее чем из двух метамеров и полученные из активно регенерирующих, стерильных эксплантов, независимо на двух исследуемых типах питательных сред, после пассажа сохраняли жизнеспособность, и активно формировали аксиллярные побеги. Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие высоких концентраций (0,75 мг/л) 24-эпибрассинолида в составе питательной среды способствует стабилизации сортов голубики высокой в культуре *in vitro*.



После того, как нами была установлена эффективность модифицированной питательной среды Андерсона, способствующей существенному увеличению количества стерильных, активно регенерирующих эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* трех исследуемых сортов голубики высокой (Река, Элизабет и Денисблю), для контроля эффективности, по отработанной методике вводили в культуру *in vitro* четыре новых сорта голубики высокой (Дюк, Нельсон, Блюголд и Эрлиблю), с высадкой эксплантов на модифицированную среду Андерсона. Результаты исследований регенерационной активности эксплантов сортов 'Дюк', 'Нельсон', 'Блюголд', 'Эрлиблю' *in vitro* также приведены в таблице 3. Анализ данных свидетельствует о том, что культивирование эксплантов на модифицированной среде Андерсона в подавляющем большинстве случаев (за единственным исключением, 41,66% эксплантов сорта 'Нельсон') обеспечивает выход не менее половины (50,00–72,73%) стерильных, активно регенерирующих эксплантов вводимых в культуру *in vitro* сортов голубики высокой. Поскольку после пассажа, все без исключения вторичные экспланты сохраняли способность к активному побегообразованию *in vitro*, можно рекомендовать разработанный нами состав модифицированной среды Андерсона для гарантированного введения и стабилизации в культуре *in vitro* практически любого сорта голубики высокой *V. corymbosum* L. Привлекательность предлагаемого метода заключается также в снижении затрат (в частности, в сокращении расхода дорогостоящего цитокинина) на введение и стабилизацию сортов голубики высокой *in vitro*, в связи с высоким процентным выходом стерильных, активно регенерирующих первичных эксплантов, сохраняющих регенерационную активность *in vitro* после пассажа.

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.

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*.

Культивирование первичных эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированной среде WPM, содержащей 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида, после предварительной стерилизации первичных эксплантов, в среднем, приводит к выходу 36,7 % стерильных, активно регенерирующих эксплантов.

Культивирование первичных эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированной среде Андерсона, содержащей 1,00 мг/л зеатина, 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида, а также повышенные концентрации сульфата меди (в 10 раз – 0,25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) и хлорида кобальта (в 2 раза – 0,05 мг/л $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), после предварительной стерилизации первичных эксплантов, в среднем, приводит к выходу 65,07% стерильных, активно регенерирующих эксплантов, что в 1,8 раз выше соответствующего показателя на модифицированной среде WPM.



Все без исключений, вторичные, стерильные экспланты, состоящие не менее чем из двух метамеров и полученные из активно регенерирующих, стерильных эксплантов, независимо на двух исследуемых типах модифицированных питательных сред – WPM и Андерсона, после пассажа сохраняли стерильность и способность к активному побегообразованию *in vitro*, что свидетельствует о стабилизации всех семи исследуемых сортов голубики высокой в культуре *in vitro*.

Применение 0,75 мг/л 24-эпибрасинолида 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.

Предлагаемый метод стерилизации первичных эксплантов в сочетании с последующим их культивированием на модифицированной питательной, агаризованной среде Андерсона указанного химического состава, рекомендуется для гарантированного введения и стабилизации в культуре *in vitro* практически любого сорта голубики высокой *V. corymbosum* L. в течение 8–10 недель.

Список литературы

1. Рупасова Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова [и др.]. – Мн., 2007. – 442 с.
2. Сидорович Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Мн., 1996. – 246 с.
3. Решетников В.Н. Некоторые аспекты микрклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // Плодоводство. – 2007. – Т. 19. – С. 209–216.
4. Волотович А.А. Разработка и внедрение инновационной технологии ускоренного производства посадочного материала растений семейств Vacciniaceae и Ericaceae на базе УО «Полесский государственный университет» / А.А. Волотович, О.А. Кудряшова, И.Э. Бученков, В.Г. Лягуский, Ю.Н. Деркач // Материалы IV межд. науч.-практ. конференции «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы», Пинск, 20–22 мая 2010 г. – Пинск, 2010. – Ч. II. – С. 163–165.
5. Trigiano R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
6. Hayat S. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / S. Hayat, A. Ahmad. – 2010. – 462 p.
7. Волотович А.А. Результаты деятельности НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» как модель развития прикладной биотехнологии на базе ВУЗа / А.А. Волотович // 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.
8. Глеб Е.П., Усиление регенерационной активности голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* в присутствии 24-эпибрасинолида / Е.П. Глеб, Е.С. Гук, И.О. Беда, О.А. Кудряшова, А.А. Волотович // Материалы V международной молодежной науч.-практ. конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси». Пинск: ПолесГУ, 2011. Ч. III. С. 227–229.
9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
10. Боровиков В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 688 с.