

УДК 57.085:634.73:547-314

О. А. КУДРЯШОВА, А. А. ВОЛОТОВИЧ

## МЕТОД ВВЕДЕНИЯ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM*) В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Полесский государственный университет, Пинск, e-mail: volant777@tut.by

(Поступила в редакцию 06.07.2011)

**Введение.** 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].

Известно, что процесс клонального микроразмножения растений *in vitro* начинается с этапа введения растений в культуру *in vitro* путем изолирования и стерилизации первичного экспланта с последующим его размещением на стерильной питательной среде для инициации побегообразования *in vitro* [2, 3].

Ранее сообщалось о том, что с увеличением концентрации 24-эпибрасинолида в составе питательной, агаризованной среды на основе WPM для введения в культуру *in vitro* существенно повышается количество активно регенерирующих, стерильных эксплантов сортовой голубики высокой [5]. Результаты исследований легли в основу заявки № А20110076 от 20.01.2011 г. о выдаче патента Республики Беларусь на изобретение, зарегистрированной в Национальном центре интеллектуальной собственности Республики Беларусь.

В настоящей статье впервые осуществлен сравнительный анализ результатов исследований регенерационной активности эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных питательных, агаризованных средах с органическими соединениями и на макро-, микросолевого основе WPM и Андерсона, дополнительно содержащих 24-эпибрасинолид в высокой концентрации.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» в марте – июне 2011 г.

В качестве объекта исследований использовали 7 перспективных сортов голубики высокой *V. corymbosum* L.: Река, Элизабет, Денис блю, Дюк, Нельсон, Блюголд, Эрлиблю.

В качестве первичных эксплантов для стерилизации и введения в культуру *in vitro* использовали неодревесневшие, верхушечные фрагменты стебля длиной 15 мм с 1–2 почками. Общее количество эксплантов всех исследуемых сортов составило 200 шт. В качестве стерилизующего агента по модифицированной методике введения растений *V. corymbosum* L. в культуру *in vitro* [2] использовали 7,5%-ный раствор гипохлорита натрия при продолжительности экспозиции эксплантов 25 мин. После стерилизации и отмывки в стерильной дистиллированной воде экспланты сортов Река, Элизабет, Денис блю высаживали в пробирки диаметром 22 мм на питательные агаризованные среды с органическими соединениями и на макро-, микросолевого основе WPM [6] с 15 мг/л 6-(г, г-диметилаллиламино)пурина и Андерсона [6] с 1 мг/л зеатина, содержащие дополнительно 0,75 мг/л 24-эпибрасинолида. Модификация среды Андерсона также заключалась в повышении концентраций 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  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ . Учет общего количества стерильных эксплантов и стерильных активно регенерирующих эксплантов проводили через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре + 25 °С, фотопериоде день/ночь – 16 ч / 8 ч, освещенности 6000 лк (4 люминесцентные лампы OSRAM L36W/76 Natura), относительной влажности воздуха 70 %. Окончательный учет жизнеспособности и регенерационной активности эксплантов введенных в культуру *in vitro* сортов осуществляли через неделю после пассажа на питательную агаризованную среду на макро- и микро- солевой основе Андерсона с 1 мг/л зеатина при непрерывном культивировании на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре + 25 °С, фотопериоде день/ночь – 16 ч / 8 ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70 %. Факт стабилизации сорта в культуре *in vitro* фиксировался только при условии сохранения жизнеспособности и регенерационной активности у всех (100 %) эксплантов после пассажа.

Сорта Дюк, Нельсон, Блюголд, Эрлиблю вводили в культуру *in vitro* в апреле-мае 2011 г. по приведенной выше методике, ориентируясь на полученные результаты по введению сортов Река, Элизабет, Денис блю. После стерилизации и отмывки экспланты высаживали на модифицированную питательную, агаризованную среду на макро- и микросолевой основе Андерсона с 1 мг/л зеатина, с повышенным содержанием сульфата меди – 0,25 мг/л  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  и хлорида кобальта – 0,05 мг/л  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , дополненную 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида. Учет общего количества стерильных эксплантов и стерильных, активно регенерирующих эксплантов проводили через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре + 25 °С, фотопериоде день/ночь – 16 ч/8 ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70 %.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [7].

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследований регенерационной активности эксплантов сортов Река, Элизабет, Денис блю *in vitro* приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Выход стерильных, активно регенерирующих *in vitro* эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных питательных средах WPM и Андерсона

Сорт	WPM		Андерсон	
	Общее количество первичных эксплантов, шт.	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %	Общее количество первичных эксплантов, шт.	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %
Река	29	33,30	30	71,45
Элизабет	11	9,09	11	54,54
Денис блю 1	16	62,50	11	72,73
Денис блю 2	11	40,00	13	61,54

П р и м е ч а н и е. Денис блю 1 – введение *in vitro* сорта Денис блю от 8 марта 2011 г.; Денис блю 2 – введение *in vitro* сорта Денис блю от 15 марта 2011 г. WPM и Андерсон – тип модифицированных питательных, агаризованных сред.

Согласно полученным данным, 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 исключения, 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*.

Брассиностероиды (стероидные гормоны растений) являются перспективной и наименее изученной группой природных регуляторов роста растений. По химической природе – это произво-

дные оксистероидов с лактонной группой в кольце В, повышающие устойчивость растений к стрессу, ускоряющие рост и развитие растений, вступая в синергизм с другими фитогормонами (в частности, с ауксинами) [8]. Некоторыми исследователями установлено, что брассиностероиды, подобно активным формам кислорода, индуцируют и регулируют экспрессию определенных антиоксидантных генов, усиливают активность ключевых антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу, пероксидазу и каталазу [9–12]. И брассиностероиды, и активные формы кислорода действуют как вторичные посредники индукции и регуляции антиоксидантных систем в растительных организмах в условиях стресса [13]. Брассиностероиды ускоряют синтез этилена на этапе между S-аденозилметионином и 1-аминоциклопропан-1-карбоксильной кислотой [12, 14]. Как известно, этилен стимулирует синтез абсцизовой кислоты, 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 таким сложным опосредованным эффектом брассиностероидов связана эффективность применения 24-эпибрассинолида на этапе инициации побегообразования у регенерантов сортовой голубики высокой при введении в культуру *in vitro*, выражающаяся в достоверном и существенном увеличении количества стерильных, активно регенерирующих эксплантов.

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 (табл. 1), для контроля эффективности по отработанной методике вводили в культуру *in vitro* четыре новых сорта голубики высокой, с высадкой эксплантов на модифицированную среду Андерсона. Результаты исследований регенерационной активности эксплантов сортов Дюк, Нельсон, Блюголд, Эрлиблю *in vitro* приведены в табл. 2.

Таблица 2. Выход стерильных, активно регенерирующих *in vitro* эксплантов сортов голубики высокой Дюк, Нельсон, Блюголд, Эрлиблю на модифицированной питательной среде Андерсона

Сорт	Общее количество первичных эксплантов, шт.	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %
Дюк	14	71,43
Нельсон	13	41,66
Блюголд	29	65,52
Эрлиблю	12	50,00

Анализ данных табл. 1 и 2 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.

**Заключение.** 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 36,22 % 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 исключения, вторичные стерильные экспланты, состоящие не менее чем из двух ме-тамеров 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*.

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.

Авторы выражают благодарность заведующему лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, члену-корреспонденту НАН Беларуси, д. х. н., профессору В. А. Хрипачу за предоставленный для исследований 24-эпибрассинолид.

## Литература

1. Рунцова Ж. А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси. Мн., 2007.
2. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Мн., 1996.
3. Решетников В. Н., Антипова Т. В., Филипья В. Л. // Плодоводство. 2007. Т. 19. С. 209–216.
4. Волотович А. А., Кудряшова О. А., Бученков И. Э. и др. // Материалы IV междунар. науч.-практ. конф. «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы». Пинск, 2010. Ч. II. С. 163–165.
5. Глеб Е. П., Гук Е. С., Беда И. О. и др. // Материалы V междунар. молодежной науч.-практ. конф. «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси». Пинск, 2011. Ч. III. С. 227–229.
6. Trigiano R. N., Gray D. J. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. US/MA, CRC Press LLC. 1999–2000.
7. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М., 1985.
8. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Groot A. E. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. San Diego: Academic Press, 1999.
9. Mazorra L. M., Nunez M., Hechovarria M. et al. // Biol. Plant. 2002. Vol. 45. P. 593–596.
10. Nunez M., Mazzafera P., Mazorra L. M. et al. // Biol. Plant. 2003. Vol. 47. P. 67–70.
11. Ogwenio J. O., Song X. S., Shi K. et al. // J. Plant Growth Regul. 2008. Vol. 27. P. 49–57.
12. Joo S., Seo Y. S., Kim S. M. et al. // Physiol. Plant. 2006. Vol. 126. P. 592–604.
13. Ashraf M., Akram N. A., Arteca R. N., Foolad M. R. // Crit. Rev. in Plant Sci. 2010. Vol. 29. P. 162–190.
14. Arteca R. N. Rooting. Plant growth substances. Principles and applications. N. Y.: Chapman and Hall, 1995. P. 127–145.

O. A. KUDRYASHOVA, A. A. VOLOTOVICH

### METHOD OF INTRODUCTION OF THE HIGHBUSH BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM*) CULTIVARS IN VITRO

#### Summary

At introduction *in vitro* stage the results of the comparative analysis of regenerating activity of high-bush blueberry explants on modified nutrient mediums 'WPM' and 'Anderson' are resulted. The method of the guaranteed introduction and stabilization in culture *in vitro* for almost any of high-bush blueberry cultivars within 8–10 weeks is offered. The method is based on cultivation of explants after sterilization on the modified nutrient medium of 'Anderson' containing 1.00 mg/l of zeatin, 0.75 mg/l of 24-epibrassinolid, and also the raised concentration of copper sulfate (in 10 times, 0.25 mg/l of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and cobalt chloride (in 2 times, 0.05 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) that, on the average, lead to an exit of 65.07 % of sterile, actively regenerated *in vitro* explants, keeping regenerating activity *in vitro* after a passage.