

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1:57.085:634.73:547-314

ЭФФЕКТЫ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА ПРИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ
In Vitro ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ

© 2012 г. О. А. Кудряшова*, А. А. Вологович*, Т. И. Василевская**, Н. П. Варавина**,
Ж. А. Рупасова**, В. А. Хрипач***

* Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

** Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

*** Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 21.07.2011 г.

Для выяснения влияния 24-эпибрасинолида (ЭБ) на эффективность регенерации *in vitro* голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) сорта Brigitta blue проанализировали изменчивость семи биопродукционных параметров у регенерантов при культивировании на различающихся по гормональному составу питательных средах. Установлены эффекты аддитивности ЭБ, цитокинина (2iP) и ауксина (ИУК) по параметрам: коэффициент размножения, масса регенерантов и содержание антоциановых пигментов. Наиболее высокие коэффициенты размножения отмечены у регенерантов на средах с 0.25 мг/л ЭБ, 7.25 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК и 0.05 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 0.50 мг/л ИУК. Для размножения регенерантов сортовой голубики высокой *in vitro* в промышленных масштабах предлагается использовать сочетания низких концентраций 2iP и ЭБ.

Ключевые слова: *Vaccinium corymbosum* – 24-эпибрасинолид – ИУК – 6-(γ,γ -диметил-аллиламино)-пурин – антоцианы – микроразмножение *in vitro*

ВВЕДЕНИЕ

Брассиностероиды (стероидные гормоны растений, БС) являются перспективной группой природных регуляторов роста растений [1]. По химической природе – это производные оксистероидов с лактонной группой в кольце В. Внутриклеточный путь передачи сигнала и регуляция экспрессии генов начинается со связывания молекул БС с мембранным рецептором растительных клеток, представляющим собой BRI1-BAK1-киназный комплекс [2, 3]. Активированный рецептор запускает 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 [4]. В ядре растительных клеток факторы транскрипции распознают нуклеотидные последовательности про-

моторной области генов-мишеней и после связывания с ними запускают экспрессию этих генов.

БС стимулируют различные физиологические процессы в растительных клетках, включающие изменение мембранного потенциала, фотосинтетической и ферментативной активности, баланса фитогормонов [5]. В действии БС на рост и развитие растений отмечены также эффекты синергизма с другими фитогормонами, в частности, с ауксинами [4]. Регуляция роста и дифференцировки растительных клеток, опосредованная БС, приводит к усилению реакции *геотропизма*, удлинению стебля, ускорению развития листа и роста пыльцевой трубки, дифференциации ксилемы, повышению жизнеспособности пыльцы, задержке старения листьев и повышению устойчивости растений к стрессам [6, 7].

Голубика высокая – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Республики Беларусь, особенно в южной агроклиматической зоне [8]. Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* рассматривается как один из основных промежуточных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах. Результаты научных исследований, проведенных на базе Научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве (Учреждение образо-

Сокращения: БС – брассиностероиды; КР_П – коэффициент размножения для побегов; КР_Э – коэффициент размножения для эксплантов; ЛА – лейкоантоцианы; СА – собственно антоцианы; САП – сумма антоциановых пигментов; ЭБ – 24-эпибрасинолид; 2iP – 6-(γ,γ -диметилаллиламино)-пурин; WPM – питательная среда для древесных растений.
Адрес для корреспонденции: Кудряшова Оксана Александровна. Республика Беларусь, 225710, Пинск, ул. Днепровской Флотилии, 23. Полесский государственный университет. Факс: +375-165-31-21-95; электронная почта: volant777@tut.by

Таблица 1. Варианты состава агаризованных питательных сред

№ среды	Вариант	Состав среды
1	Контроль 1 (общий эталон сравнения)	Без фитогормонов
2	Контроль 2	7.25 мг/л 6-(γ , γ -диметилаллиламино)-пурина (2iP)
3	Контроль 3	1.00 мг/л ИУК
4	Контроль 4	7.25 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
5	Опыт	0.05 мг/л 24-эпибрасинолида (ЭБ)
6	»	0.15 мг/л ЭБ
7	»	0.25 мг/л ЭБ
8	»	0.05 мг/л ЭБ, 7.25 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
9	»	0.15 мг/л ЭБ, 7.25 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
10	»	0.25 мг/л ЭБ, 7.25 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
11	»	0.05 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
12	»	0.15 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
13	»	0.25 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 1.00 мг/л ИУК
14	»	0.05 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 0.50 мг/л ИУК
15	»	0.15 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 0.50 мг/л ИУК
16	»	0.25 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP, 0.50 мг/л ИУК
17	»	0.05 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP
18	»	0.15 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP
19	»	0.25 мг/л ЭБ, 2.00 мг/л 2iP

вания “Полесский государственный университет”) в 2009–2011 гг. [9], позволили существенно изменить традиционные [10] в Республике Беларусь подходы к клональному микроразмножению растений голубики высокой. В частности, они позволили усовершенствовать составы питательных сред и сделать процесс производства посадочного материала более технологичным (заявка № А20110076 от 20.01.2011 г. о выдаче патента Республики Беларусь на изобретение) [11].

В настоящей статье приведены результаты анализа биопродукционных параметров у стерильных, размножаемых *in vitro* регенерантов голубики высокой сорта *Brigitta blue* на различающихся по гормональному составу питательных средах, в том числе в присутствии разных концентраций 24-эпибрасинолида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории (НИЛ клеточных технологий в растениеводстве) УО “Полесский государственный университет” в период январь–март 2011 г.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты позднеспелого сорта *Brigitta blue* голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), в количестве не менее 80 регенерантов для каждого варианта опыта (всего

19 вариантов, 1520 регенерантов), включая 4 контрольных варианта (не менее 320 регенерантов). Регенеранты получали при культивировании эксплантов, состоящих из двух метамеров, в конических колбах (объемом 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной питательной среды на микро-, макро- солевой основе питательной среды для древесных растений (WPM) [12], по 20 эксплантов на колбу. Варианты опыта различались только по гормональному составу агаризованной питательной среды (табл. 1).

Все среды вариантов контроля (1–4) отличались по гормональному составу от состава стандартной питательной среды для размножения регенерантов, содержавшей 5.00 мг/л 2iP и 1.00 мг/л ИУК [9, 10]. Все среды вариантов опыта, содержавшие 2iP, также отличались друг от друга по концентрации 2iP и по соотношению цитокинин : ауксин от стандартной питательной среды для размножения регенерантов.

Колбы с регенерантами размещали на стеллажах культурального помещения биотехнологической лаборатории и культивировали при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде (свет), освещенности 6 клк (4 люминесцентные лампы OSRAM L36W/76, “Natura”) и относительной влажности воздуха 70%. Через 8 нед. культивирования у регенерантов при помощи миллиметровой бумаги (ГОСТ 334-73) измеряли высоту побегов и рассчитывали высоту регенеранта, как сред-

Таблица 2. Изменчивость биопродукционных параметров у регенерантов сорта Brigitta blue голубики высокой *in vitro*

№№	Вариант	КР _П	КР _Э	Высота растения, см	Масса регенерата, г	СА, мг%	ЛА, мг%	САП, мг%
1	Контроль (основа WPM)	1.1 ± 0.2	2.0 ± 0.6	1.50 ± 0.19	0.016 ± 0.004	254 ± 6	3069 ± 111	3324 ± 114
2	2iP _{7.25}	4.4 ± 0.3	4.8 ± 0.8	1.77 ± 0.06	0.039 ± 0.001	168 ± 5	2148 ± 45	2315 ± 49
3	ИУК _{1.00}	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.3	2.74 ± 0.17	0.018 ± 0.001	163 ± 7	2306 ± 29	2468 ± 37
4	2iP _{7.25} + ИУК _{1.00}	4.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3	0.93 ± 0.05	0.036 ± 0.016	313 ± 10	2935 ± 93	3248 ± 103
5	ЭБ _{0.05}	1.4 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.31 ± 0.13	0.016 ± 0.007	213 ± 11	2785 ± 115	2998 ± 126
6	ЭБ _{0.15}	1.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	1.89 ± 0.10	0.014 ± 0.001	176 ± 7	3594 ± 68	3770 ± 75
7	ЭБ _{0.25}	2.1 ± 0.3	3.4 ± 0.4	2.15 ± 0.12	0.019 ± 0.007	208 ± 11	3664 ± 89	3872 ± 99
8	2iP _{7.25} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.05}	4.7 ± 0.7	6.9 ± 1.6	1.00 ± 0.05	0.030 ± 0.013	601 ± 13	4563 ± 110	5164 ± 118
9	2iP _{7.25} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.15}	4.4 ± 0.6	6.2 ± 0.1	0.98 ± 0.06	0.043 ± 0.019	296 ± 32	2798 ± 69	3095 ± 102
10	2iP _{7.25} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.25}	6.5 ± 0.5	9.2 ± 1.2	0.99 ± 0.04	0.031 ± 0.010	537 ± 19	4295 ± 174	4832 ± 189
11	2iP _{2.00} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.05}	4.0 ± 0.5	8.2 ± 0.3	1.82 ± 0.11	0.067 ± 0.003	694 ± 24	3647 ± 62	4341 ± 40
12	2iP _{2.00} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.15}	5.0 ± 0.1	8.0 ± 0.3	1.38 ± 0.06	0.134 ± 0.002	773 ± 7	2859 ± 44	3633 ± 37
13	2iP _{2.00} + ИУК _{1.00} + ЭБ _{0.25}	3.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	1.49 ± 0.08	0.100 ± 0.017	1133 ± 24	3321 ± 27	4454 ± 49
14	2iP _{2.00} + ИУК _{0.50} + ЭБ _{0.05}	5.4 ± 0.1	9.8 ± 1.2	1.55 ± 0.06	0.071 ± 0.002	575 ± 38	3016 ± 65	3591 ± 92
15	2iP _{2.00} + ИУК _{0.50} + ЭБ _{0.15}	4.1 ± 0.3	8.0 ± 1.0	1.70 ± 0.06	0.084 ± 0.009	1316 ± 15	2830 ± 53	4146 ± 68
16	2iP _{2.00} + ИУК _{0.50} + ЭБ _{0.25}	3.9 ± 0.1	6.9 ± 0.2	1.72 ± 0.07	0.091 ± 0.003	1180 ± 34	3579 ± 19	4759 ± 15
17	2iP _{2.00} + ЭБ _{0.05}	5.0 ± 0.1	7.5 ± 0.8	1.39 ± 0.06	0.094 ± 0.003	687 ± 13	3094 ± 15	3781 ± 21
18	2iP _{2.00} + ЭБ _{0.15}	3.3 ± 0.2	6.3 ± 1.0	1.52 ± 0.09	0.082 ± 0.013	1180 ± 42	3413 ± 19	4593 ± 46
19	2iP _{2.00} + ЭБ _{0.25}	3.9 ± 0.1	6.7 ± 0.3	1.65 ± 0.06	0.066 ± 0.009	893 ± 44	3599 ± 11	4492 ± 45
НСР _{0.05}		1.0	2.0	0.25	0.025	62	214	244
НСР _{0.01}		1.4	2.7	0.33	0.034	83	285	325

Примечание. КР_П – коэффициент размножения побегов; КР_Э – коэффициент размножения эксплантов; СА – собственно антоцианы; ЛА – лейкоантоцианы; САП – сумма антоциановых пигментов; мг% – мг в 100 г сырой массы. НСР_{0.05} – наименьшая существенная разница при уровне значимости $P < 0.05$; НСР_{0.01} – наименьшая существенная разница при уровне значимости $P < 0.01$. То же для табл. 3–5.

нее арифметическое высоты всех побегов одного регенеранта; учитывали количество побегов у каждого регенеранта и рассчитывали коэффициенты размножения (как количество развившихся побегов из одного экспланта – КР_П, и как количество полноценных эксплантов для последующего размножения, получаемое от одного регенеранта – КР_Э); измеряли массу регенерантов и анализировали содержание собственно антоцианов (СА) по методу Шнайдемана и Афанасьевой [13], а содержание лейкоантоцианов (ЛА) и суммы антоциановых пигментов (САП) в регенерантах – по методу Swain и Hillis [14]. Содержание ЛА рассчитывали, как разницу между суммарным содержанием САП и содержанием СА.

Общий математический анализ данных (среднее арифметическое ± стандартная ошибка, расчет показателей наименьшей существенной разницы при уровнях значимости $P < 0.05$ и $P < 0.01$) проводили по стандартным методам вариационной статистики

[15] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 приведены результаты анализа изменчивости семи исследованных параметров у регенерантов голубики высокой *in vitro*. Присутствие цитокинина 2iP в составе питательной агаризованной среды во всех случаях (варианты 2, 4, 8–19, табл. 1) приводило к достоверному ($P < 0.01$) увеличению коэффициентов размножения для эксплантов (КР_Э) и для побегов (КР_П) в 2.5–5.0 и в 3–6 раз соответственно.

Присутствие в составе питательной среды только 24-эпибрассинолида (ЭБ) в разных концентрациях (варианты 5–7, табл. 1) достоверно ($P < 0.01$) увеличивало высоту регенерантов на 4–8 мм. В присутствии 0.15 и 0.25 мг/л ЭБ в регенерантах достоверно ($P < 0.01$) увеличивалось содержание ЛА, а также САП приблизительно в

Таблица 3. Изменчивость основных биопродукционных параметров у регенерантов сорта *Brigitta blue* голубики высокой *in vitro* в присутствии ЭБ в разных концентрациях

Вариант	КР _П			КР _Э			Высота растения, см			Масса регенеранта, г		
	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}
2iP _{7.25} + ИУК _{1.00}	4.7	4.3	6.5**	6.9	6.2	9.2**	1.00	0.99	0.99	0.03	0.04	0.03
2iP _{2.00} + ИУК _{0.50}	5.4*	4.1	3.9	9.8**	8.0*	6.9	1.55**	1.71**	1.72**	0.07**	0.08**	0.09**
2iP _{2.00} + ИУК _{1.00}	4.0	5.0*	3.2	8.2	8.0*	5.2	1.82**	1.39**	1.49**	0.07**	0.13**	0.10**
2iP _{2.00}	5.1*	3.3	3.9	7.4	6.2	6.7	1.40**	1.52**	1.65**	0.09**	0.08**	0.07**
НСР _{0.05}	0.5	0.5	0.5	1.4	1.4	1.4	0.09	0.09	0.09	0.01	0.01	0.01
НСР _{0.01}	0.8	0.8	0.8	2.1	2.1	2.1	0.13	0.13	0.13	0.02	0.02	0.02

Примечание. Жирным выделены наивысшие значения показателей. * – значимо при $P < 0.05$; ** – значимо при $P < 0.01$. То же для табл. 4.

1.2 раза. В присутствии 0.15 мг/л ЭБ достоверно ($P < 0.05$) уменьшалось содержание СА в регенерантах.

В присутствии только ИУК в составе питательной среды (вариант 3, табл. 1) наблюдали достоверное ($P < 0.01$) увеличение высоты регенерантов в 1.8 раза, а также снижение содержания антоциановых пигментов: СА – в 1.6 раза; ЛА и САП – в 1.4 раза.

Сочетание ЭБ с 2iP и ИУК (варианты 8–16, табл. 1) во всех случаях приводило к достоверному ($P < 0.01$) увеличению показателей коэффициентов размножения КР_П и КР_Э. Наиболее высокие коэффициенты размножения отмечали у регенерантов на следующих средах: вариант 10 (цитоканин : ауксин = 7 : 1; КР_П = 6.5; КР_Э = 9.2) и вариант 14 (цитоканин : ауксин = 4 : 1; КР_П = 5.4; КР_Э = 9.8). Сочетание ЭБ с 2.0 мг/л 2iP (как в присутствии, так и в отсутствие ИУК, варианты 11–19, табл. 1) во всех случаях приводило к достоверному ($P < 0.01$) увеличению показателей массы регенерантов в 4.0–8.5 раз. Наиболее высокой массой характеризовались регенеранты на следующих средах: вариант 12 (цитоканин : ауксин = 2 : 1; масса одного регенеранта = 0.134 г) и вариант 13 (цитоканин : ауксин = 2:1; масса одного регенеранта = 0.100 г). Сочетание ЭБ с 2.0 мг/л 2iP (как в присутствии, так и в отсутствие ИУК, варианты 11–19, табл. 1) во всех случаях приводило также к достоверному ($P < 0.01$) увеличению содержания СА в регенерантах в 2.0–4.5 раз. Наиболее высоким содержанием СА характеризовались регенеранты на следующих средах: вариант 15 (цитоканин : ауксин = 4 : 1; СА = 1316 мг%); вариант 13 (цитоканин : ауксин = 2 : 1; СА = 1133 мг%); вариант 16 (цитоканин : ауксин = 4 : 1; СА = 1180 мг%); вариант 18 (СА = 1180 мг%). Сравнительный анализ результатов по вариантам 8–10 (соотношение цитоканин : ауксин = 7 : 1), 11–13 (соотношение цитоканин : ауксин = 2 : 1) и 14–16 (соотношение

цитоканин : ауксин = 4 : 1) позволил установить следующее: наиболее высоким содержанием СА обладали регенеранты, выросшие на средах с соотношением цитоканин : ауксин = 4 : 1, в присутствии повышенных (0.15 и 0.25 мг/л) концентраций ЭБ; наименьшим содержанием СА – регенеранты, выросшие на средах с ЭБ и соотношением цитоканин : ауксин = 7 : 1.

Наиболее высоким содержанием ЛА обладали регенеранты, выросшие на следующих средах: вариант 8 (цитоканин : ауксин = 7 : 1; ЛА = 4563 мг%) и вариант 10 (цитоканин : ауксин = 7 : 1; ЛА = 4295 мг%). Сочетание 2iP и ИУК с ЭБ в концентрациях 0.05 и 0.25 мг/л приводило к увеличению (в большинстве случаев достоверному при $P < 0.01$) содержания ЛА в регенерантах, в то время как сочетание 2iP и ИУК с ЭБ в концентрации 0.15 мг/л приводило к достоверному ($P < 0.05$) снижению содержания ЛА в регенерантах.

В присутствии ЭБ в составе питательных сред во всех случаях, за исключением вариантов 5 и 9 (табл. 1) наблюдали достоверное (чаще при $P < 0.01$) повышение показателей САП в регенерантах.

Сравнительный анализ изменчивости биопродукционных параметров у регенерантов, сформированных на питательных средах с ЭБ в сочетании с другими фитогормонами – 2iP и ИУК, по данным табл. 3 и 4, позволил установить в подавляющем большинстве случаев аддитивность эффектов при совместном действии ЭБ, 2iP и ИУК. Аддитивность чаще проявлялась при сочетании 0.15 мг/л ЭБ (умеренная концентрация) с 2.0 мг/л 2iP (низкая концентрация), в отсутствие либо в присутствии ИУК (в любой из двух исследованных концентраций – 0.5 или 1.0 мг/л), т.е. при соотношениях цитоканин : ауксин = 2 : 0, 2 : 1, 4 : 1. При повышении концентрации 2iP до 7.25 мг/л (варианты 8–10, соотношение цитоканин : ауксин = 7 : 1) эффект аддитивности чаще проявлял-

Таблица 4. Изменчивость содержания антоциановых пигментов у регенерантов сорта Brigitta blue голубики высокой *in vitro* в присутствии ЭБ в разных концентрациях

Вариант	СА, мг%			ЛА, мг%			САП, мг%		
	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}	ЭБ _{0.05}	ЭБ _{0.15}	ЭБ _{0.25}
2iP _{7.25} + ИУК _{1.00}	601	296	537	4563**	2798	4296**	5164**	3095	4832**
2iP _{2.00} + ИУК _{0.50}	574	1316**	1180**	3016	2830	3578	3591	4146**	4759**
2iP _{2.00} + ИУК _{1.00}	694**	773**	1133**	3647	2859	3321	4341	3633**	4454
2iP _{2.00}	687**	1180**	893**	3094	3413**	3599	3781	4593**	4492
НСР _{0.05}	41	41	41	105	105	105	122	122	122
НСР _{0.01}	57	57	57	143	143	143	166	166	166

Примечание. Жирным выделены наивысшие значения показателей.

ся в присутствии высокой концентрации ЭБ – 0.25 мг/л.

Наиболее высокие коэффициенты размножения (по побегам и по эксплантам) в порядке убывания отмечены у регенерантов на средах из вариантов 10 (соотношение цитокинин : ауксин = 7 : 1), 14 (цитокинин : ауксин = 4 : 1) и 12 (цитокинин : ауксин = 2 : 1) (табл. 3). При сочетании 2.0 мг/л 2iP с низкой (0.05 мг/л) концентрацией ЭБ (вариант 17) наблюдали увеличение у регенеранта количества побегов, не позволяющих получить полноценные экспланты, представленные не менее, чем двумя метамерами. При сочетании 2.0 мг/л 2iP и 0.5 мг/л ИУК с умеренной (0.15 мг/л) концентрацией ЭБ (вариант 15) наблюдали сравнительно умеренное побегообразование, но длина побегов и количество междоузлий позволили получить достаточно высокое количество полноценных эксплантов (табл. 3).

При анализе коэффициентов размножения были выявлены 2 эффекта (табл. 3). Первый был связан с тем, что при высоких концентрациях 2iP (7.25 мг/л) значения коэффициентов размножения (KP_{Π} и KP_{Σ}) у регенерантов достигали максимальных значений при концентрации ЭБ 0.25 мг/л. Второй был эффект связан с тем, что при низких концентрациях 2iP (2.0 мг/л) значения коэффициентов размножения (KP_{Π} и KP_{Σ}) у регенерантов в большинстве случаев достигали максимальных значений при низкой концентрации ЭБ (0.05 мг/л). При соотношении цитокинин : ауксин, равном 4 : 1 (2.0 мг/л 2iP и 0.5 мг/л ИУК), значения коэффициентов размножения (KP_{Π} и KP_{Σ}) уменьшались с увеличением концентрации ЭБ.

Не менее важные эффекты аддитивности действия фитогормонов установлены при анализе изменчивости высоты и массы регенерантов (табл. 3). При сочетании низкой концентрации 2iP (2.0 мг/л) с ЭБ у регенерантов с увеличением концентраций ЭБ наблюдали увеличение высоты и уменьшение массы. Добавление в состав среды ИУК в концентрации 0.5 мг/л привело к тому, что

с увеличением концентрации ЭБ у регенерантов увеличивались и высота, и масса. Дальнейшее увеличение концентрации ИУК до 1.0 мг/л в среде приводило к тому, что с увеличением концентрации ЭБ у регенерантов уменьшалась высота и увеличивалась масса. При высокой концентрации 2iP (7.25 мг/л) в сочетании с 1.0 мг/л ИУК и ЭБ в разных концентрациях значения высоты и массы регенерантов, с одной стороны, существенно уступали таковым у регенерантов, росших при низкой концентрации 2iP (2.0 мг/л), а с другой, – практически не изменялись при увеличении концентрации ЭБ (табл. 3).

Анализ изменчивости содержания антоциановых пигментов у регенерантов на средах, сочетающих ЭБ в разных концентрациях с другими фитогормонами, также выявил ряд важных эффектов (табл. 4). Известно, что антоцианы, являющиеся вторичными метаболитами группы флавоноидов, не только придают характерную окраску плодам голубики, но и обладают ценными фармакологическими свойствами, такими как антиоксидантное, адаптогенное, спазмолитическое и противовоспалительное действие. При низких концентрациях 2iP (2.0 мг/л) в сочетании с ЭБ у регенерантов наблюдали повышенное содержание СА, достигающее максимального значения (1180 мг%) при умеренной концентрации ЭБ (0.15 мг/л).

Добавление 0.50 мг/л ИУК в состав среды с 2.0 мг/л 2iP приводило к некоторому снижению содержания СА в регенерантах при низкой концентрации ЭБ (0.05 мг/л) и существенному увеличению их содержания при более высоких концентрациях ЭБ. Максимальное значение (1316 мг%), как и в предыдущем случае, наблюдали при концентрации ЭБ 0.15 мг/л. Дальнейшее повышение концентрации ИУК до 1.0 мг/л приводило к некоторому снижению содержания СА у регенерантов, которое сохранялось достаточно высоким (табл. 4). В данном случае с увеличением концентрации ЭБ в составе среды прослеживалась закономерность увеличения содержания СА

у регенерантов. При высоких концентрациях 2iP (7.25 мг/л), в присутствии 1.0 мг/л ИУК и ЭБ, наблюдали выраженное снижение содержания СА у регенерантов, достигающее при концентрации ЭБ 0.15 мг/л минимальных ($CA_{ЭБ\ 0.15} = 296$ мг%) значений (близких к значениям у регенерантов на безгормональной среде, а именно, $CA_{WPM} = 254$ мг%, по данным табл. 2), и увеличивающееся с повышением, либо уменьшением концентрации ЭБ до 0.25 мг/л ($CA_{ЭБ\ 0.25} = 537$ мг%), и до 0.05 мг/л ($CA_{ЭБ\ 0.05} = 601$ мг%) соответственно.

Наиболее высокое содержание ЛА у регенерантов отмечали на средах с 7.25 мг/л 2iP и 1.0 мг/л ИУК, в сочетании с низкой (0.05 мг/л) и высокой (0.25 мг/л) концентрациями ЭБ. При этом величина ЛА составляла 4563 и 4295 мг% соответственно (табл. 4). При низких концентрациях 2iP (2.0 мг/л) с увеличением концентрации ЭБ у регенерантов наблюдали повышение содержания ЛА, достигающее максимальных значений при 0.15 мг/л ЭБ (3413 мг%) и 0.25 мг/л ЭБ (3599 мг%). При добавлении в среду ИУК (0.50 и 1.0 мг/л), а также при повышении концентрации 2iP до 7.25 мг/л, в сочетании с 1.0 мг/л ИУК и в присутствии 0.15 мг/л ЭБ, происходило существенное снижение содержания ЛА у регенерантов. При этом минимальное содержание ЛА, как и в случае с собственными антоцианами, наблюдали у регенерантов, выросших на средах с 7.25 мг/л 2iP, 1.0 мг/л ИУК и 0.15 мг/л ЭБ (табл. 4).

Наиболее высокое содержание САП отмечали у регенерантов при сочетании 7.25 мг/л 2iP с 1.0 мг/л ИУК и 0.05 мг/л ЭБ (5164 мг%), либо 7.25 мг/л 2iP с 1.0 мг/л ИУК и 0.25 мг/л ЭБ (4832 мг%), либо 2.0 мг/л 2iP с 0.50 мг/л ИУК и 0.25 мг/л ЭБ (4759 мг%), либо 2.0 мг/л 2iP и 0.15 мг/л ЭБ (4593 мг%) (табл. 4). Установлена закономерность существенного убывания уровня САП у регенерантов на средах с 0.15 мг/л ЭБ при повышении концентраций 2iP (от 2.0 до 7.25 мг/л) с усилением эффекта в присутствии и с повышением концентрации ИУК от 0.5 до 1.0 мг/л (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ изменчивости биопродукционных параметров у регенерантов выявил эффект аддитивности при сочетании ЭБ с 2iP и ИУК. Наиболее сильно этот эффект был выражен в присутствии 0.15 мг/л ЭБ и 2.0 мг/л 2iP, при соотношении цитокинин : ауксин = 2 : 0, 2 : 1 и 4 : 1. При повышении концентрации 2iP до 7.25 мг/л эффект аддитивности проявлялся в сочетании с более высокими концентрациями ЭБ (0.25 мг/л, по данным табл. 2 и 4). Другими авторами были установлены эффекты синергизма брассиностероидов, активных ауксинов и Ca^{2+} , а также аддитивные эффекты, обнаруживаемые по стимуляции продукции

этилена при их использовании в комбинации с цитокининами [17–20].

Установленные нами закономерности позволяют рекомендовать применение ЭБ в концентрации 0.05–0.15 мг/л при меньшем расходе цитокинина (2.0 мг/л 2iP) для повышения эффективности микроразмножения *in vitro* (показатели $KP_{П}$ и $KP_{Э}$, табл. 2 и 3).

Полученные результаты комплексного действия ЭБ, 2iP и ИУК, применительно к исследованным признакам “высота” и “масса” регенерантов, неоднозначны и противоречивы. Присутствие в составе среды 2iP в низкой (2.0 мг/л) концентрации с повышением концентрации ЭБ приводило к увеличению высоты и уменьшению массы регенерантов. Дополнение среды ИУК (0.5 и 1.0 мг/л) в сочетании с низкой концентрацией ЭБ (0.05 мг/л), приводило к увеличению как высоты, так и массы регенерантов, а в сочетании с умеренной (0.15 мг/л) и высокой концентрацией ЭБ (0.25 мг/л) – к уменьшению высоты и увеличению массы регенерантов (табл. 3).

Анализ содержания антоцианов позволяет выдвинуть предположение о том, что практически все исследованные комбинации ЭБ, 2iP и ИУК являлись стрессовыми для регенерантов (табл. 4). Брассиностероиды (БС) регулируют растительные ответы на биотический и абиотический стресс и на присутствие других фитогормонов. При этом запускается цепь событий, таких как распознавание сигнала, образование вторичных посредников, изменение внутриклеточного потока Ca^{2+} , накопление активных форм кислорода (окислительный стресс), фосфорилирование белков и транскрипция генов, необходимых для синтеза АБК, этилена, жасмоновой и салициловой кислот [5, 21]. БС и АБК взаимодействуют между собой и регулируют экспрессию сотен генов, охватывая разнообразные биологические процессы. Экзогенная АБК снимает опосредованные БС эффекты. Считается, что АБК- и БС-иницированные каскады реакций сигнальной трансдукции первоначально пересекаются после восприятия сигнала БС, но до активации генов-мишеней. При этом подавляющее большинство генов-мишеней БС регулируется АБК. В условиях стресса синтез АБК усиливается. АБК нарушает передачу БС-сигнала, при этом регуляция трансдукции БС-сигнала может осуществляться через PP2C-семейство протеинфосфатаз, включающее AVI1 и AVI2 [22].

Ранее было установлено, что БС индуцируют и регулируют экспрессию определенных антиоксидантных генов, усиливают активность ключевых антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу, пероксидазу и каталазу [23–26]. В растительных организмах при стрессах БС спо-

способны индуцировать и регулировать работу антиоксидантных систем [27].

Известно, что антоцианы являются сильными антиоксидантами. По нашим данным, в результате аддитивного взаимодействия фитогормонов содержание антоцианов повышалось (в большинстве случаев достоверно) у регенерантов, культивируемых на агаризованных питательных средах с одновременным присутствием цитокинина (2iP), ЭБ и ИУК, и в меньшей степени – в отсутствие ИУК (табл. 2 и 4).

Кроме того, показан синергизм между действием БС и ауксинов в отношении регуляции роста и пролиферации клеток. Тем не менее, кинетика этих процессов под влиянием БС и ауксинов различалась. В то время, как эффект ауксина проявлялся очень быстро и быстро достигал максимума, то БС-опосредованный ответ оказался более растянутым во времени и достигал максимума гораздо позже. Синергизм часто наблюдался при многократной обработке одновременно двумя гормонами [4]. При этом БС повышали чувствительность проростков арабидопсиса к ауксину, и комбинированная обработка двумя гормонами существенно повышала уровень и продолжительность экспрессии генов [28].

Эффект ауксина и БС в регуляции клеточного роста может проявляться в перестройке цитоскелета. В клетках гипокотилия арабидопсиса фибриллы целлюлозы сгруппированы в параллельные кольца перпендикулярно апикально-базальной оси клетки, способствуя удлинению этой оси. Ориентация вновь синтезируемых фибрилл определяется ориентацией нижележащих кортикальных микротрубочек. Как плотность, так и ориентация кортикальных микротрубочек зависит, по крайней мере, частично, от исходного БС-опосредованного пути передачи сигнала, так как у некоторых БС-мутантов β -тубулиновая генная экспрессия уменьшена, и кортикальные микротрубочки расположены беспорядочно. Эти эффекты снимаются экзогенной обработкой БС. В гипокотилиях арабидопсиса дикого типа обработка ауксином, так же как и обработка БС, может запускать перестройку кортикальных микротрубочек. Как ИУК, так и БС индуцируют экспрессию генов, которые кодируют разрушающие клеточную стенку ферменты [4].

Установлено, что БС в присутствии ауксина и цитокинина увеличивает частоту клеточных делений, причем для осуществления клеточной пролиферации в побегах и корнях необходимым условием является наличие БС. В каллусной культуре БС могут замещать цитокинины и, тем самым, способствуют прохождению клеточного цикла. Возможно, присутствие БС расширяет спектр активности ауксина и дает возможность полностью заменять цитокинин в каллусной

культуре. Направленность действия ауксинов и БС зависит от их концентрации. В низких концентрациях фитогормоны проявляют стимулирующее действие, в высоких – ингибирующее. Таким образом, незначительные изменения концентрации гормонов могут полностью изменять морфологические ответы, в частности, такие, как удлинение клеток [4].

Данные последних лет [4] показали, что изменения в уровне экспрессии генов, индуцируемой ауксином и БС, могут перекрываться, и одни и те же мишени способны воспринимать и ауксиновый, и БС-сигнал. Такие гены-мишени обычно сильнее реагируют на ауксин и слабее на БС, и в целом, БС-индуцируемая транскрипция протекает менее выражено. Напротив, ауксин-индуцируемая транскрипция всегда более быстрая, с ярко выраженной амплитудой. Медленный БС-ответ может означать, что для БС-индуцируемой транскрипции нужны промежуточные этапы. Например, эффекты БС на ауксин-индуцируемые гены могут быть опосредованы БС-индуцируемыми генами *AUX/IAA*. В присутствии БС уровень ауксина изменяется незначительно, поскольку БС не ускоряет биосинтез ауксина, а усиливает действие ауксина в фоновой концентрации.

Гены биосинтеза БС находятся под контролем молекул как БС, так и ауксина. Например, *BRX (BREVIS RADIX)*, ген-мишень ауксина, кодирует белок, ускоряющий биосинтез БС для поддержания его на уровне, способном вызывать ауксин-индуцируемый ответ. Гены, кодирующие ферменты, лимитирующие скорость биосинтеза БС, являются ауксин-индуцируемыми. Таким образом, с одной стороны, уровень БС ограничивает биосинтез ауксина, а ауксин-индуцируемые ответы. С другой стороны, ауксиновый контроль по типу обратной связи способствует поддержанию определенного гомеостатического уровня БС. В то же время, экспрессия генов, кодирующих белки, которые снижают уровень ауксина путем изменения интенсивности его полярного транспорта, частично контролируется БС [4].

Некоторыми авторами [29] отмечено повышение содержания свободных и связанных форм АБК и ИУК в присутствии ЭБ и ионов Cu^{2+} . Причем эффект в большей степени проявлялся в отношении АБК. При обработке растений ЭБ и Cu^{2+} наблюдали повышение содержания фитохелатина, аскорбиновой кислоты, общих фенолов и пролина, что обеспечивало усиление антиоксидантной активности. В нашем исследовании, ионы Cu^{2+} и Ca^{2+} присутствуют в составе питательной среды для культивирования регенерантов *Brigitta blue*, и, по всей видимости, также способны оказывать совместное с ЭБ действие на изменчивость биопродукционных параметров у голубики высокой *in vitro*.

Экспериментально доказано, что при повышении концентрации ЭБ усиливается фотосинтез и повышается содержание хлорофиллов *a* и *b* [30, 31]. БС и ауксин ускоряют биосинтез этилена. Во многих случаях, например, таких как перегруппировка микротрубочек или тропизмы, этилен может замещать ауксин и БС. Ауксины и БС осуществляют контроль за уровнем этилена, проявляя синергетическое взаимодействие через регуляцию транскрипции генов, кодирующих ферменты, лимитирующие синтез этилена [4]. БС ускоряют биосинтез этилена на этапе между S-аденозилметионином и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислотой [18, 25]. Как известно, этилен стимулирует синтез АБК, которая ускоряет старение клеток, тормозит биохимические процессы, являясь антагонистом ауксинов, цитокининов и гиббереллинов.

При стрессах повышение концентрации этилена в тканях играет защитную роль. Например, стрессовый этилен индуцирует синтез защитных фитоалексинов и фермента хитиназы, разрушающего клеточные стенки грибов (в том числе, патогенных). Возможно, именно с подобным эффектом БС связана эффективность применения ЭБ на этапе инициации побегообразования у регенерантов сортовой голубики высокой при ее асептическом введении в культуру *in vitro*, выражающаяся в достоверном увеличении количества стерильных, активно регенерирующих эксплантов [11].

В нашем исследовании установлено, что применение экзогенного ЭБ в составе агаризованной питательной среды на микро-/макросолевого основе (WPM) для размножения *in vitro* регенерантов *V. corymbosum* вместе с цитокинином (2iP) и ауксином (ИУК) приводит к изменению количественных и качественных параметров роста и развития регенерантов (эксплантов) в культуре *in vitro*. Установленный эффект повышения коэффициентов размножения регенерантов при сочетании 2iP и ИУК с ЭБ в низких концентрациях открывает широкие возможности для практического применения ЭБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayat S., Ahmad A. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. Berlin: Springer-Verlag, 2010. 462 p.
2. Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. Structural Basis of Steroid Hormone Perception by the Receptor Kinase BRI1 // Nature. 2011. V. 474. P. 467–471.
3. She J., Han Zh., Kim T., Wang J., Cheng W., Chang J., Shi Sh., Wang J., Yang M., Wang Zh., Chai J. Structural Insight into Brassinosteroid Perception by BRI1 // Nature. 2011. V. 474. P. 472–476.
4. Hardtke Ch.S., Dorcey E., Osmont K.S., Sibout R. Phytohormone Collaboration: Zooming in on Auxin-Brassinosteroid Interactions // Trends Cell Biol. 2007. V. 17. P. 485–492.
5. Mussig C., Altmann T. Physiology and Molecular Mode of Action of Brassinosteroids // Plant Physiol. Biochem. 1999. V. 37. P. 363–372.
6. Yin Y., Wang Zh., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida Sh., Asami T., Chory J. BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation // Cell. 2002. V. 109. P. 181–191.
7. Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida Sh., Asami T., Chory J. A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in Arabidopsis // Cell. 2005. V. 120. P. 249–259.
8. Рунцова Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси. Минск: Белорус. наука, 2007. 442 с.
9. Волотович А.А. Результаты деятельности НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО “Полесский государственный университет” как модель развития прикладной биотехнологии на базе ВУЗа // Матер. V межд. науч.-практ. конф. “Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы” (Пинск, 28–29 апреля 2011 г.). Пинск: ПолесГУ, 2011. Ч. I. С. 286–288.
10. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Минск: Наука і тэхніка, 1996. 246 с.
11. Глеб Е.П., Гук Е.С., Беда И.О., Кудряшова О.А., Волотович А.А. Усиление регенерационной активности голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* в присутствии 24-эпибрасинолида // Матер. V межд. молод. науч.-практ. конф. “Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси”. Пинск: ПолесГУ, 2011. Ч. 3. С. 227–229.
12. Trigiano R.N., Gray D.J. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Boca Raton: CRC, 2000. 454 p.
13. Шнайдем Л.О., Афанасьева В.С. Методика определения антоциановых веществ // Реф. и докл. общ. IX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Москва, 1965. С. 79–80.
14. Swain F., Hillis W. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. I. The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents // J. Sci. Food Agric. 1959. V. 10. P. 63–68.
15. Доснехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
16. Боровиков В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере. СПб.: Питер, 2001. 650 с.
17. Arteca R.N., Tsai D.S., Schlagenhauser C.D., Mandava N.B. The Effects of Brassinolide on Auxin-Induced Ethylene Production by Etiolated Mung Bean Segments // Physiol. Plant. 1983. V. 59. P. 539–544.
18. Arteca R.N. Rooting // Plant Growth Substances. Principles and Applications / Ed. Arteca R.N. New York: Chapman and Hall, 1995. P. 127–145.
19. Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T., Bennett M. Auxin Cross-Talk: Integration of Signaling Pathways to Control Plant Development // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. P. 411–426.
20. Maureen H., Hyun S.C., Kieber J.J. Regulation of ACS Protein Stability by Cytokinin and Brassinosteroid // Plant J. 2009. V. 57. P. 606–614.

21. Рябушкина Н.А. Синергизм действия метаболитов в ответных реакциях растений на стрессовые факторы // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 614–621.
22. Zhang S., Cai Z., Wang X. The Primary Signaling Outputs of Brassinosteroids Are Regulated by Abscisic Acid Signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V.106. P. 4543–4548.
23. Mazorra L.M., Nunez M., Hechovarria M., Coll F., Sanchez-Blanco M.J. Influence of Brassinosteroids on Antioxidant Enzymes Activity in Tomato under Different Temperatures // Biol. Plant. 2002. V. 45. P. 593–596.
24. Nunez M., Mazzafera P., Mazorra L.M., Siqueira W.J., Zullo M.A.T. Influence of Brassinosteroid Analogue on Antioxidant Enzymes in Rice Grown in Culture Medium with NaCl // Biol. Plant. 2003. V. 47. P. 67–70.
25. Joo S., Seo Y.S., Kim S.M., Hong D.K., Park K.Y., Kim W.T. Brassinosteroid Induction of AtACS4 Encoding an Auxin-Responsive 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase 4 in Arabidopsis Seedlings // Physiol. Plant. 2006. V. 126. P. 592–604.
26. Ogweno J.O., Song X.S., Shi K., Hu W.H., Mao W.H.M., Zhou Y.H., Yu J.Q., Nogues S. Brassinosteroids Alleviate Heat-Induced Inhibition of Photosynthesis by Increasing Carboxylation Efficiency and Enhancing Antioxidant Systems in *Lycopersicon esculentum* // J. Plant Growth Regul. 2008. V. 27. P. 49–57.
27. Ashraf M., Akram N.A., Arteca R.N., Foolad M.R. The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Brassinosteroids and Salicylic Acid in Plant Processes and Salt Tolerance // Crit. Rev. Plant Sci. 2010. V. 29. P. 162–190.
28. Vert G., Walcher C.L., Chory J., Nemhauser J.L. Integration of Auxin and Brassinosteroid Pathways by Auxin Response Factor 2 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 9829–9834.
29. Choudhary S.P., Bhardwaj R., Gupta B.D., Dutt P., Gupta R.K., Biondi S., Kanwar M. Epibrassinolide Induces Changes in Indole-3-Acetic Acid, Abscisic Acid and Polyamine Concentrations and Enhances Antioxidant Potential of Radish Seedlings under Copper Stress // Physiol. Plant. 2010. V. 140. P. 280–296.
30. Kalituho L.N., Chaika M.T., Mazhul V.M., Khripach V.A. Effect of 24-Epibrassinolide on Pigment Apparatus Formation // Proc. Twenty-Third Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America. Calgary, 1996. P. 36–40.
31. Свами К.Н., Рао С.С.Р. Влияние 24-эпибрасинолида на рост, фотосинтез и содержание эфирных масел у *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 682–687.