

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ БИОПРОДУКЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. IN VITRO В ПРИСУТСТВИИ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА

О.А. Кудряшова, А.А. Волотович

УО «Полесский государственный университет»

Введение. Брассиностероиды являются перспективной группой природных регуляторов роста растений [1]. По химической природе – это производные окистероидов с лактонной группой в кольце В. Брассиностероиды стимулируют различные физиологические изменения в растительных клетках, включающие изменение мембранного потенциала, фотосинтетической и ферментной активности, баланса эндогенных фитогормонов [2]. В действии брассиностероидов на рост и развитие растений отмечены также эффекты синергизма с другими фитогормонами, в частности, с ауксинами [3]. 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 [4, 5].

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Республики Беларусь, особенно в южной агроклиматической зоне страны [6]. Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* L. рассматривается как один из основных промежуточных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах. В настоящей статье приведены результаты и анализ изменчивости биопродукционных параметров у размножаемых *in vitro* регенерантов сорта «Brigitta blue» голубики высокой, на различающихся по фитогормональному составу питательных агаризованных средах. Обсуждаются эффекты 24-эпибрассинолида, 6-(γ,γ -диметил-аллил-амино)-пурина, индолилуксусной кислоты и их комбинаций на изменчивость ростовых показателей и содержание антоциановых пигментов в регенерантах.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет».

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты позднеспелого сорта «Brigitta blue» голубики высокой *V. corymbosum* L., в количестве не менее 80 регенерантов для каждого варианта опыта, в четырехкратной повторности.

Регенеранты получали в результате культивирования эксплантов (состоящих из двух метамеров) в колбах конических (объемом по 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной, питательной среды на микро-, макро- солевой основе WPM [7, 8], содержащей 7,50 мг/л 6-(γ,γ -диметилаллиламин)пурина и 1,00 мг/л индолилуксусной кислоты, из расчета 20 эксплантов/колбу. Кислотность питательной среды (pH) 4,8–5,0. Варианты опыта различались по содержанию 24-эпибрассинолида и других фитогормонов в составе агаризованной, питательной среды:

1. Контроль 1 (общий эталон сравнения) – без фитогормонов;
2. Контроль 2 – 7,25 мг/л 6-(γ,γ -диметилаллиламин)пурина (2iP);
3. Контроль 3 – 1,00 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК);
4. Контроль 4 – 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;
5. 0,01 мг/л 24-эпибрассинолида (ЭБ);
6. 0,05 мг/л ЭБ;
7. 0,15 мг/л ЭБ;
8. 0,25 мг/л ЭБ;
9. 0,50 мг/л ЭБ;
10. 0,75 мг/л ЭБ;
11. 0,01 мг/л ЭБ; 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;
12. 0,05 мг/л ЭБ; 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;
13. 0,15 мг/л ЭБ; 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;

14. 0,25 мг/л ЭБ; 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;
15. 0,50 мг/л ЭБ; 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК;
16. 0,75 мг/л ЭБ; 2,00 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК.

Через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день / ночь – 16 ч / 8 ч, освещенности 6000 лк / м² (4 люминесцентных лампы *OSRAM L36W/76 Natura*), относительной влажности воздуха 70%, анализировали изменчивость массы и высоты регенерантов, коэффициенты размножения (как количество развившихся побегов из одного экспланта – КР_п, и как количество полноценных эксплантов для последующего размножения, получаемое из одного регенеранта – КР_э), содержание собственно антоцианов по методу Л.О. Шнайдемана и В.С. Афанасьевой, 1965 [9], лейкоантоцианов и суммы антоциановых пигментов по методу F. Swain и W. Hillis, 1959 [10] в регенерантах. Содержание лейкоантоцианов рассчитывали как разницу между суммарным содержанием антоциановых пигментов и содержанием собственно антоцианов.

Единица измерения собственно антоцианов, лейкоантоцианов и суммы антоциановых пигментов – мг%, т.е. количество мг антоциановых пигментов в 100 г сырой массы регенеранта.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [11], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [12]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа AB-Stat v.1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [13].

Результаты и их обсуждение. Результаты изменчивости анализируемых признаков у регенерантов приведены в таблице 1. В соответствии с полученными данными присутствие цитокинина 2iP в составе питательной агаризованной среды приводило к достоверному и существенному увеличению количества побегов и эксплантов во всех исследуемых случаях по сравнению с остальными (без 2iP) вариантами опыта. Тем не менее, следует отметить тенденцию существенного, в отдельных случаях достоверного увеличения показателей коэффициентов размножения с увеличением концентрации ЭБ в пределах 0,05-0,50 мг/л (варианты 12–15). Наиболее высокие, достоверные при $P < 0,01$ показатели коэффициентов размножения (КР_п=6,45 и КР_э=9,19) наблюдались при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и 0,25 мг/л ЭБ (вариант 14). Следует также отметить тенденцию к снижению показателей коэффициентов размножения при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и высоких (более 0,50 мг/л) концентраций ЭБ (вариант 16), в то время как показатели коэффициента размножения по эксплантам КР_э возрастали с увеличением концентрации ЭБ в пределах 0,01-0,75 мг/л на фоне основы WPM в вариантах опыта 5–10, хотя по величине оставались ниже показателей в вариантах 12–16 (таблица 1).

Регенеранты в вариантах 5–10 (разные концентрации ЭБ на фоне WPM) по высоте достоверно (при $P < 0,01$) превышали регенеранты из вариантов 11–16 (сочетание 2iP, ИУК и разные концентрации ЭБ). Наиболее высокими – 2,7 см – были регенеранты из варианта 3 (ИУК на фоне WPM), при коэффициентах размножения на уровне контрольного варианта 1 (таблица 1). Следует отметить, что достоверно наиболее низкими (по отношению к контролю) регенерантами отмечались варианты с сочетанием 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и разных концентраций ЭБ. Поскольку эти же варианты характеризовались наиболее высокими коэффициентами размножения регенерантов, а побеги для пассажа черенковали из расчета получения эксплантов, состоящих из 2–3 метамеров, можно заключить, что у регенерантов, сформированных в вариантах 12–16, междоузлий было больше по количеству, но более коротких по длине.

Что касается морфологии регенерантов, для вариантов 1, 3, 5–10 были характерны длинные одиночные, слегка извилистые побеги с удлиненными междоузлиями и крупными листьями. С повышением концентрации ЭБ наблюдалась тенденция изменения окраски стебля от светло-зеленой и салатно-розовой к малиновой. В варианте 3 (1,00 мг/л ИУК на фоне WPM) у регенерантов формировались корни. Варианты 11–16 характеризовались более высокими показателями количества побегов. При этом побеги обладали короткими междоузлиями и мелкими, удлиненными у основания побегов листьями, а также формировали петлеобразные изгибы на границе поверхности питательной агаризованной среды. В некоторых случаях у основания побега регенеранта формировался «клубок» из узких, удлиненных листьев, напоминающих по форме побег. Количество «деформированных» регенерантов возрастало с возрастанием концентрации ЭБ.

Таблица 1 – Показатели биопродукционных параметров у регенерантов сорта *Brigitta blue* голубики высокой *in vitro*

Вариант опыта	КРп	КРэ	ВР	СВР	СА	ЛА	САП
Контроль (WRM-основа)	1,075±0,225	2,000±0,600	1,503±0,185	0,016±0,004	254,733±6,463	3069,567±110,874	3324,300±114,900
ИУК _{1,00}	1,000±0,050	2,150±0,300	2,743±0,174**	0,018±0,001	162,667±7,055**	2305,600±29,632**	2468,267±36,688**
2iP _{7,25}	4,375±0,325**	4,775±0,825**	1,775±0,059	0,039±0,001	168,000±4,619**	2147,733±45,577**	2315,733±49,997**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00}	4,355±0,255**	5,165±0,265**	0,928±0,048	0,036±0,016	312,800±9,735	2935,417±93,251	3248,217±102,758
ЭБ _{0,01}	1,100±0,050	2,200±0,300	1,896±0,156**	0,014±0,003	273,517±11,687	3157,550±59,854	3431,067±70,663
ЭБ _{0,05}	1,425±0,025	2,550±0,300	2,314±0,133**	0,016±0,007	212,800±11,386	2785,167±114,967*	2997,967±126,312**
ЭБ _{0,15}	1,875±0,075	2,825±0,025	1,895±0,101**	0,014±0,001	175,783±6,988*	3594,500±68,564**	3770,283±75,409**
ЭБ _{0,25}	2,075±0,325	3,425±0,375	2,149±0,125**	0,019±0,007	208,367±10,616	3663,767±89,462**	3872,067±99,493**
ЭБ _{0,50}	1,875±0,175	3,300±0,100	2,276±0,115**	0,017±0,005	241,617±8,647	3743,050±79,811**	3984,667±87,984**
ЭБ _{0,75}	1,975±0,235	3,315±0,425	2,284±0,113**	0,022±0,001	183,667±5,605*	3833,383±100,907**	4017,050±97,218**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,01}	5,925±1,075**	2,500±0,350	1,414±0,062	0,018±0,001	717,750±21,424**	3115,367±65,340	3833,117±81,701**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,05}	4,725±0,725**	6,925±1,625**	1,001±0,046	0,030±0,013	601,000±12,940**	4563,033±110,548**	5164,033±117,665**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,15}	4,350±0,600**	6,225±0,075**	0,985±0,056	0,043±0,019*	296,117±32,714	2798,483±69,496*	3094,600±101,717
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,25}	6,450±0,550**	9,190±1,240**	0,996±0,049	0,031±0,010	536,900±19,950**	4295,450±174,169**	4832,350±189,797**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,50}	5,350±0,200**	7,475±0,175**	1,318±0,056	0,032±0,002	620,400±26,534**	4203,150±82,885**	4823,550±109,414**
2iP _{7,25} +ИУК _{1,00} + ЭБ _{0,75}	4,175±0,425**	4,750±0,250**	0,801±0,042	0,019±0,001	763,667±38,319**	4392,250±92,670**	5155,917±130,966**
НСР _{0,05}	1,092	2,016	0,254	0,025	62,831	214,454	243,778
НСР _{0,01}	1,481	2,735	0,333	0,034	83,781	285,961	325,063

* значимо при $P < 0,05$; ** значимо при $P < 0,01$; КРп – коэффициент размножения, побеги; КРэ – коэффициент размножения, экпланты; ВР – высота растений, см; СВР – сырой вес регенеранта, г; СА – собственно антоцианы, мг%; ЛА – лейкоантоцианы, мг%; САП – сумма антоциановых пигментов, мг%.

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ показателей биопродукционных параметров у регенерантов сорта Brigitta blue голубики высокой *in vitro*

ИВ	df	КРл		КРэ		СВР		ВР	
		СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%
Общее	27	3,668	-	5,304	-	0,000	-	0,710	-
Фактор А	1	81,806**	82,6	73,063**	51,0	0,001*	26,6	134,986**	34,0
Фактор В	6	1,025	6,2	6,498**	27,2	0,000	8,7	2,778**	4,2
АхВ	6	0,884	5,4	3,12*	14,3	0,000	15,8	2,700**	4,1
Повторности	1	0,284	0,3	0,117	0,1	0,000	4,4	1,007	9,9
Случайные отклонения	13	0,421	5,5	0,813	7,4	0,000	44,5	0,374	47,8

«->» означает отсутствие данных; ИВ – источник варьирования; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – состав питательной среды; фактор В – концентрация 24-эпибрасинолида.

Таблица 3 – Двухфакторный дисперсионный анализ содержания антоциановых пигментов у регенерантов сорта Brigitta blue голубики высокой *in vitro*

ИВ	df	СА		ЛА		САП	
		СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%
Общее	41	43708,650	-	380887,300	-	560590,800	-
Фактор А	1	1131749,000**	63,2	1292733,000**	8,3	4843749,000**	21,1
Фактор В	6	55311,940**	18,5	1284254,000**	49,3	1597526,000**	41,7
АхВ	6	49801,560**	16,7	968863,300**	37,2	1252387,000**	32,7
Повторности	2	2128,556	0,2	74468,260	1,0	101759,800	0,9
Случайные отклонения	26	975,691	1,4	25230,970	4,2	32210,780	3,6

В присутствии 2iP наблюдалась тенденция увеличения массы регенерантов. Единственный, достоверно (при $P < 0,01$) наиболее высокий показатель массы регенеранта (0,043 г) наблюдался при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и 0,15 мг/л ЭБ (вариант 13).

По содержанию собственно антоцианов, при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и разных концентраций ЭБ наблюдалось достоверное, прямо корреляционное увеличение показателей с возрастанием концентрации ЭБ (варианты 11, 12, 14–16). В вариантах 5–10, с увеличением концентрации ЭБ в пределах 0,01–0,75 мг/л на фоне основы WPM содержание собственно антоцианов чаще снижалось (достоверно при $P < 0,05$ для варианта 7) по отношению к контролю. По содержанию лейкоантоцианов и по сумме антоциановых пигментов в большинстве случаев наблюдалось достоверное, прямо корреляционное увеличение показателей с возрастанием концентрации ЭБ как на фоне WPM, так и при сочетании ЭБ с 2iP и ИУК (таблица 1). Наиболее высокие показатели при этом отмечены для вариантов 12, 14–16, сочетающих 2iP, ИУК и ЭБ.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное (чаще при $P < 0,01$) влияние исследуемых факторов – состава питательной среды и концентрации 24-эпибрассинолида, а также сочетания данных факторов на изменчивость признаков «высота регенерантов» и «коэффициенты размножения/экспланты» (таблица 2). Доля влияния фактора «состав питательной среды» при этом превалировала и составляла 51% и 34%, соответственно. На изменчивость признаков «масса регенеранта» и «коэффициент размножения/побеги» достоверное влияние оказывал только состав питательной среды. Доля влияния фактора составила 27% и 83%, соответственно (таблица 2).

Анализ изменчивости содержания антоциановых пигментов выявил достоверное влияние исследуемых факторов – состава питательной среды и концентрации 24-эпибрассинолида, а также сочетания данных факторов на изменчивость всех исследуемых признаков (таблица 3).

Таким образом, установлена тенденция существенного, в отдельных случаях достоверного увеличения показателей коэффициентов размножения с увеличением концентрации ЭБ в пределах 0,05–0,50 мг/л, в присутствии 7,25 мг/л 2iP и 1,00 мг/л ИУК. При этом наиболее высокие, достоверные при $P < 0,01$ показатели коэффициентов размножения ($KP_{II}=6,45$ и $KP_{Э}=9,19$) наблюдались при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и 0,25 мг/л ЭБ.

Установлено, что при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и разных концентраций ЭБ в составе питательной среды существенно уменьшалась высота регенерантов, но увеличивалось количество коротких (по длине) междоузлий.

По содержанию собственно антоцианов, лейкоантоцианов и суммы антоциановых пигментов, при сочетании 7,25 мг/л 2iP; 1,00 мг/л ИУК и разных концентраций ЭБ наблюдалось достоверное, прямо корреляционное увеличение показателей исследуемых признаков с возрастанием концентрации ЭБ. По содержанию лейкоантоцианов и по сумме антоциановых пигментов, в большинстве случаев также наблюдалось достоверное, прямо корреляционное увеличение показателей с возрастанием концентрации ЭБ на фоне WPM.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное (чаще при $P < 0,01$) влияние исследуемых факторов – состава питательной среды и концентрации 24-эпибрассинолида, а также сочетания данных факторов на изменчивость признаков «высота регенерантов», «коэффициенты размножения/экспланты», «содержание собственно антоцианов», «содержание лейкоантоцианов» и «сумма антоциановых пигментов».

По результатам исследований в Национальном центре интеллектуальной собственности Республики Беларусь зарегистрирована заявка № А20110929 от 04.07.2011 г. о выдаче патента на изобретение «Способ повышения содержания антоциановых пигментов в регенерантах сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* при использовании 24-эпибрассинолида».

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

Литература

1. Hayat, S. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / S. Hayat, A. Ahmad. 2010. – 462 p.
2. Mussig, C. Physiology and Molecular Mode of Action of Brassinosteroids / C. Mussig, T. Altmann // Plant Physiol. Biochem. – 1999. – Vol. 37, № 5. – P. 363–372.
3. Hardtke, Ch.S. Phytohormone Collaboration: Zooming in on Auxin-Brassinosteroid Interactions / Ch.S. Hardtke, E. Dorsey, K.S. Osmont, R. Sibout // Trends in Cell Biology. – 2007. – Vol. 17, № 10. – P. 485–492.

4. Yin, Y. A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in Arabidopsis / Y. Yin, D. Vafeados, Y. Tao, Sh. Yoshida, T. Asami, J. Chory // Cell. – 2005. – Vol. 120. – P. 249–259.

5. Yin, Y. BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation / Y. Yin, Zh. Wang, S. Mora-Garcia, J. Li, Sh. Yoshida, T. Asami, J. Chory // Cell. – 2002. – Vol. 109. – P. 181–191.

6. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова. – Мн.: Белорус. наука, 2007. – 442 с.

7. 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.

8. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микрклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // Плодоводство. – 2007. – Т. 19. – С. 209–216.

9. Шнайдман, Л.О. Методика определения антоциановых веществ / Л.О. Шнайдман, В.С. Афанасьева // Рефераты и доклады сообщений. IX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – М., 1965. – С. 79–80.

10. Swain, F. The phenolic constituents of Prunus domestica. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents / F. Swain, W. Hillis // J. Sci. Food Agric. – 1959. – V. 10, № 1. – P. 63–68.

11. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

12. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.

13. Аношенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Аношенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.