

**Влияние brassinостероидов на температурную адаптацию *in vitro*
микрогаметофитов томата сорта Чирок**

Дацик О.И., Лукьянчик И.Д.

Брестский государственный университет им. А.С. Пушкина,
Брест, Республика Беларусь, lelya.datsik@mail.ru

Актуальность. Современная сельскохозяйственная наука вплотную подошла к тому рубежу, когда дальнейший рост продуктивности растений и качества сельскохозяйственной продукции невозможен без внедрения новейших агроприемов и технологий.

Гаметная селекция в настоящее время часто применяется как один из эффективных способов отбора устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам генотипов. Это направление основано на экспрессии большей части генов организма на уровне спорофита и гаметофита и, как следствие, значительной связи между проявлением признаков на обеих стадиях жизненного цикла. Работа с микрогаметофитами имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным использованием спорофитных поколений. Это – возможность работать с большим количеством генотипов (благодаря малому размеру пыльцевых зерен) и гаплоидный набор хромосом, позволяющий обнаружить даже редкие рецессивные гены, фенотипически не проявляющиеся в диплоидном организме [1].

На кафедре зоологии и генетики Брестского государственного университета им. А.С. Пушкина (Республика Беларусь) в 2010 году была предпринята попытка использования пыльцы растений в качестве тест-системы для выявления биологической активности ряда новосинтезированных кремнийорганических соединений (работы совместно с д.х.н. Ерчаком Н.П. и кафедрой химии БрГУ им. А.С. Пушкина) [2]. Данная микрогаметофитная тест-система по сравнению с наиболее распространенными методиками определения морфофизиологических показателей развития спорофитных поколений растений (всхожесть семян, их энергия прорастания, интенсивность роста зародышевых корешков, урожайность и др.) оказалась более точной и эффективной. В связи с этим микрогаметофитный анализ был включен в методику исследований биологической активности стероидных соединений в рамках НИР с № ГР 20160577 «Теоретико-практические аспекты биологической активности brassinостероидов и стероидных гликозидов на разных уровнях организации биологических систем» (задание ГПНИ на 2016–2020 годы «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Биорегуляторы растений»). Представленные в данной статье результаты являются частью выполнения данной научно-исследовательской работы, а именно продолжением биотестирования растворов различных концентраций brassinостероидов с использованием микрогаметофитов томата.

Препараты биологического происхождения имеют огромные преимущества перед ксенобиотиками, поскольку они свободно включаются в естественные природные цепи превращений, легко дезактивируются и расщепляются до простых химических соединений [3]. Подобного рода соединениями являются brassinosteroids – фитогормоны класса стероидов, как природного происхождения, так и их синтетические аналоги. Выяснение механизма действия brassinosteroids находится на начальном этапе и требует дальнейших обстоятельных исследований для его понимания. Открытие у brassinosteroids антистрессовых свойств к абиотическим факторам (высоким и низким температурам, засухе, засолению и др.) служит основанием для расширения сфер их применения.

Так, ранее авторами установлено, что brassinosteroids в концентрации 10^{-6} % проявляют протекторную активность при прорастании *in vitro* пыльцевых зерен томата в низкотемпературных условиях. При этом ряд активности растворов выглядел как «эпикастастерон > эпибрассинолид > гомобрассинолид» [4]. Наличие в пыльцевых зернах растений стероидных соединений позволяет предположить, что спектр активных концентраций регуляторов роста на основе brassinosteroids может быть расширен в сторону их уменьшения.

Цель работы – оценить влияние растворов эпикастастерона (далее ЭК), эпибрассинолида (ЭБ) и гомобрассинолида (ГБ) в концентрации 10^{-7} % на развитие микрогаметофитов томата сорта Чирок в условиях различных температурных режимов.

Методика исследований. Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры зоологии и генетики Брестского государственного университета А.С. Пушкина. Объект исследования – томат обыкновенный (*Solanum lycopersicum* L.), представленный среднеспелым сортом Чирок белорусской селекции (ГУО «Белорусская сельскохозяйственная академия, г. Горки»). Выбор сорта был обусловлен обнаруженной пониженной чувствительностью микрогаметофитов ранних сортов томата к воздействию БС [4]. Материал: пыльца (в количестве 500 штук на препарат). Опыты закладывались в трехкратной повторности. Этапы микрогаметофитного анализа: сбор пыльцы, посев на искусственную питательную среду (по методикам И. Н. Голубинского и А. Н. Кравченко), фиксация и окрашивание, анализ под микроскопом. Исследуемые brassinosteroids любезно предоставлены лабораторией химии стероидов ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси». В опытах использовались растворы в концентрации 10^{-7} %. Температурные режимы прорастивания пыльцы: $t = +12^{\circ} \pm 0,2$ С (хладотермостат), а так же $t = +25^{\circ} \pm 0,2$ С. Для оценки функциональных свойств пыльцы использовались следующие критерии: жизнеспособность пыльцы и длина пыльцевой трубки (в условных единицах – диаметрах пыльцевого зерна). Статистическая обработка

результатов велась с использованием программы Microsoft Excel. Для оценки достоверности различий применялся критерий Стьюдента.

Результаты исследований.

Введение в питательную среду каждого из исследуемых растворов БС (ЭК, ЭБ, ГБ) привело к различным изменениям функциональных свойств пыльцы томата сорта Чирок (таблицы 1 и 2).

Как видно из таблицы 1, в условиях как средних, так и низких положительных температур наибольшую сортовую чувствительность проявили микрогаметофиты томата по отношению к раствору ГБ (увеличение жизнеспособности по сравнению с контролем при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ составило $+30,03\%$, а при $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $+45,13\%$). Данный раствор также ускорял время начала прорастания пыльцы: при $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ пыльца проросла на 2–3 сутки по сравнению с 5-ми в контроле, при $+12\text{ }^{\circ}\text{C}$ – на 3-е сутки по сравнению с 12-ми в контроле.

Таблица 1 – Влияние растворов brassinosteroidов в концентрации $10^{-7}\%$ на жизнеспособность *in vitro* микрогаметофитов томата сорта Чирок

Жизнеспособность пыльцы, $x \pm m$, %					
$t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$			$t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$		
1.	Контроль	45,63 \pm 2,14	1.	Контроль	26,44 \pm 3,19
2.	ЭБ	63,02* \pm 1,54	2.	ЭБ	55,56* \pm 3,23
3.	ЭК	68,52* \pm 2,34	3.	ЭК	64,82* \pm 2,05
4.	ГБ	75,65* \pm 1,64	4.	ГБ	71,57* \pm 1,47

*–достоверно при уровне значимости $p < 0,001$

Высокую степень активности в отношении микрогаметофитов томата сорта Чирок так же оказал раствор ЭК. Жизнеспособность пыльцевых зерен в данном опыте была выше контрольных показателей на 22,89 % (при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и на 38,38 % (при $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$). Появление первых жизнеспособных микрогаметофитов, культивируемых на питательной среде с ЭК, так же, как и в случае с ГБ, наблюдалось на 2-3 сутки.

Наименьшую эффективность среди трех исследуемых растворов БС проявил ЭБ. Несмотря на достоверно значимые различия в величине жизнеспособности пыльцы по отношению к контролю (выше на 17,39 % (при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и на 29,12 % ($t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$)), не ускорило прорастание пыльцевых зерен.

Результаты исследования, приведенные в таблице 2, показывают степень воздействия растворов БС в концентрации $10^{-7}\%$ на длину пыльцевых трубок микрогаметофитов. Как видно из таблицы, наиболее эффективным раствором также оказался раствор ГБ. Пыльцевые

трубки в данном варианте опыта имели длину в 3,76 раза (при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и в 1,99 раза (при $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$) больше контрольных показателей.

При введении в питательную среду раствора ЭК также наблюдалась положительная динамика в увеличении длины пыльцевых трубок микрогаметофитов томата: при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ средняя длина увеличилась в 2,41 раза, а при $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 1,20 раза по сравнению с контролем.

Использование раствора ЭБ в концентрации $10^{-7}\%$ дало неожиданные результаты во всех повторностях опыта: длина пыльцевых трубок при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ была выше контрольных значений в 4,32 раза, а при $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$ удлинение отставало в 1,42 раза по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Влияние *in vitro* растворов brassinosteroidов концентрации $10^{-7}\%$ на длину пыльцевых трубок томата сорта Чирок при $t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$

Длина пыльцевых трубок, $x \pm m$, усл.ед.					
$t = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$			$t = +12\text{ }^{\circ}\text{C}$		
1.	Контроль	$3,12 \pm 0,15$	1.	Контроль	$5,46 \pm 0,19$
2.	ЭБ	$13,49^{*} \pm 0,89$	2.	ЭБ	$3,84^{*} \pm 0,23$
3.	ЭК	$7,52^{*} \pm 0,18$	3.	ЭК	$6,57^{**} \pm 0,21$
4.	ГБ	$11,75^{*} \pm 0,16$	4.	ГБ	$10,91^{*} \pm 0,27$

*–достоверно при уровне значимости $p < 0,001$

*–достоверно при уровне значимости $p < 0,05$

Выводы. Растворы эпибрасинолида, эпикастастерона и гомобрасинолида в концентрации $10^{-7}\%$ можно рассматривать как потенциальные биопротекторы, т.к. они

1) при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ оказывали стимулирующее действие на прорастающую *in vitro* пыльцу томата сорта Чирок, сокращая время прорастания, увеличивая ее жизнеспособность и длину пыльцевых трубок при этом ряд активности можно представить как $\text{ГБ} > \text{ЭК} > \text{ЭБ}$;

2) при температуре $+12^{\circ}\text{C}$ ряд активности при оценке жизнеспособности пыльцы и сроков ее прорастания был аналогичный выше указанному, однако присутствие раствора ЭБ в среде подавляло один из исследуемых показателей – длину пыльцевых трубок.

Для улучшения функциональных свойств пыльцы томата сорта Чирок наиболее эффективно использование раствора гомобрасинолида в концентрации $10^{-7}\%$.

Список использованных источников

1. Методические рекомендации по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы): метод. пособие. / Рос.академ. с/х наук; под ред. В.Ф. Пивоварова – Москва, 2001. –391 с.
2. Ломакова, О. О., Ерчак Н. П., Лукьянчик И. Д. Изучение биологической активности нового кремнийорганического вещества Е-2032 с использованием методов гаметной селекции // Итоги полевого сезона, 2010 : материалы I регион.науч. зоол. конф., посвящ. Междунар. году биоразнообразия (Брест, 11 дек. 2010 г.) / БрГУ им. А.С. Пушкина, каф.зоологии и генетики, ОО «Ахова птушак Бацькаўшчыны»; редкол.: А.Н. Тарасюк [и др.]. – Брест : Альтернатива, 2011. – С. 20-23.
3. Пугачева И. Г. Эндогенные и экзогенные факторы роста как стимуляторы жизнеспособности пыльцы томата, подвергшейся действию низкотемпературного стресса // Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения : Материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Горки, 2000. – С. 134-137.
4. Лукьянчик, И. Д., Дазик О. И., Мороз Д. Г. Использование методов гаметной селекции для оценки протекторных свойств эпикастерона в условиях низкотемпературного стресса // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов: материалы III Междун. научн.-практ. конфер., посвященной 110-летию со дня рождения акад. Н.В. Смольского. (7-9 октября 2015, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск: Конфидо, 2015. – С. 121-124