

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. IN VITRO НА СРЕДАХ РАЗНОГО ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА

О.А. ЖУДРЯШОВА, Л.С. ЦВИРКО, А.А. ВОЛОТОВИЧ

Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

**Введение.** Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Республики Беларусь, особенно в южной агроклиматической зоне страны [1].

Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* L. рассматривается как один из основных промежуточных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах [2, 3].

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*. Завершающим этапом клонального микроразмножения растений *in vitro* является их укоренение на специфических по фитогормональному составу питательных средах, стимулирующих формирование корней у регенерантов *in vitro* [3].

В настоящей статье приведены результаты и анализ изменчивости биопродукционных параметров, в том числе процент укорененных регенерантов сорта Northland голубики высокой, размножаемых *in vitro* на различающихся по фитогормональному составу питательных, агаризованных средах. Обсуждаются эффекты спектра концентраций индолилмасляной кислоты, индолилуксусной кислоты и ее комбинации с 24-эпибрассинолидом на изменчивость количественных признаков.

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

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сорта Northland голубики высокой *V. corymbosum* L. в количестве не менее 40 регенерантов для каждого варианта опыта, в трехкратной повторности.

Регенеранты получали в результате культивирования эксплантов (состоящих из трех метамеров) в колбах конических (объемом по 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной, питательной среды на S микро-, макро- солевой основе WPM [4], содержащей фитогормоны, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

1. 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК);
2. 0,5 мг/л ИУК;
3. 0,2 мг/л ИУК;
4. 1,0 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК);
5. 0,5 мг/л ИМК;
6. 0,2 мг/л ИМК;
7. 1,0 мг/л ИУК, совместно с 1,0 мг/л 24-эпибрассинолида (ЭБ);
8. 0,5 мг/л ИУК, совместно с 0,5 мг/л ЭБ;
9. 0,2 мг/л ИУК, совместно с 0,2 мг/л ЭБ.

Учет анализируемых признаков – высота регенерантов, длина третьего междоузлия, количество листьев, длина корней, сырой вес регенерантов, процент укорененных регенерантов (укореняемость) – проводили через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [5], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [6]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа АВ-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [7].

**Результаты и их обсуждение.** В таблице 1 приведены результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у регенерантов сорта Northland *in vitro*. Выделены значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) превышающие наименьший показатель по каждому анализируемому признаку в ряду вариантов опыта.

Анализ высоты регенерантов указывает на то, что присутствие в составе питательной среды 24-эпибрасинолида (в комбинации с ИУК, варианты 7–9) приводит к существенному и достоверному (при  $P < 0,01$ ) увеличению показателей признака в 1,2–1,7 раза, по сравнению с показателями признака на питательных средах с ИУК или ИМК. Причем высота регенерантов увеличивается прямо пропорционально повышению концентрации 24-эпибрасинолида. В то же самое время на среде с ИМК прослеживается обратно пропорциональная зависимость высоты регенерантов от концентрации фитогормона. А на среде с ИУК высота регенерантов вначале увеличивается с повышением концентрации фитогормона до 0,5 мг/л, но при дальнейшем повышении концентрации ИУК происходит уменьшение высоты регенерантов (табл. 1).

Аналогично анализируемому признаку высота растений в присутствии в составе питательной среды 24-эпибрасинолида (в комбинации с ИУК, варианты 7–9) происходит существенное, достоверное (при  $P < 0,01$ ) увеличение показателей количества листьев и сырого веса регенерантов, в среднем (в зависимости от концентрации) в 1,4 (1,3–1,5) и в 1,7 (1,3–2,1) раза соответственно. При этом сохраняется закономерность прямо пропорционального увеличения значения признака с ростом концентрации ЭБ в составе питательной среды. Сохраняются те же закономерности изменчивости количества листьев и сырого веса регенерантов на средах с ИМК и ИУК в разных концентрациях (варианты 1–6). А именно на среде с ИМК прослеживается обратно пропорциональная зависимость величины признака от концентрации фитогормона. На среде с ИУК величина признака вначале увеличивается с повышением концентрации фитогормона до 0,5 мг/л, но при дальнейшем повышении концентрации ИУК происходит уменьшение величины признака (табл. 1).

В пределах варианта опыта наиболее стабильным признаком была длина третьего междоузлия у регенерантов. Анализ изменчивости данного признака на средах разного гормонального состава и с разной концентрацией фитогормонов указывает на то, что в присутствии в составе питательной среды 0,2 и 0,5 мг/л 24-эпибрасинолида (в комбинации с ИУК, варианты 8, 9) происходит существенное, достоверное (при  $P < 0,01$ ) уменьшение длины третьего междоузлия у регенерантов (табл. 1). Сопоставив данные по изменчивости признаков высота растений, количество листьев и сырой вес регенерантов с данными по признаку длина третьего междоузлия, можно заключить, что побеги регенерантов, сформированных на среде с 24-эпибрасинолидом, имеют больше междоузлий. Данный эффект увеличения количества междоузлий при сокращении их длины в присутствии брасиностероидов отмечался в ранних работах по изучению их действия на биопродукционные параметры как у двудольных, так и у однодольных растений [8].

Используемые в нашем исследовании фитогормоны – ИМК и ИУК – обладают четко выраженным эффектом, проявляющимся в стимулировании формирования корней у растений, в том числе у регенерантов *in vitro*. В традиционных по составу питательных средах для укоренения регенерантов голубики высокой *in vitro* применяется 1,0 мг/ ИМК [3, 9]. Результаты наших исследований, приведенные в таблице 1, указывают на то, что для укоренения регенерантов сорта Нортланд голубики высокой целесообразнее использовать ИУК (в концентрациях 0,2 и 0,5 мг/л), либо ИМК в низких концентрациях (0,2 мг/л).

В присутствии ЭБ формирование корней у регенерантов прекращалось. Установлена также закономерность снижения частоты формирования корней у регенерантов *in vitro*, при повышении концентрации 24-эпибрасинолида в составе среды. Так, наиболее высокий показатель укореняемости регенерантов в присутствии ЭБ зафиксирован в варианте 9, при концентрации ЭБ 0,2 мг/л, в сочетании с 0,2 мг/л ИУК (табл. 1).

Исключительно короткими корнями обладали регенеранты на питательных средах с ЭБ (табл. 1). Причем прослеживается тенденция к удлинению корней с уменьшением концентрации ЭБ в составе питательной среды. Наиболее длинные корни формировались у регенерантов на средах с ИУК и ИМК в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л (варианты 1, 2, 4, 5).

В таблице 2 приведены результаты дисперсионного анализа. Установлено, что фактор «фитогормоны и их комбинации» оказывает высоко достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние на изменчивость всех анализируемых признаков. При этом доля влияния фактора на изменчивость длины корней, сырого веса и укореняемости регенерантов достигает значений 69,6–75,6% соответственно.

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у регенерантов сорта Northland голубики высокой *in vitro*

Фитогормон (в том числе комбинации)	Концентрация, мг/л	ВР, см	ДлЗМ, см	КЛ, шт.	ДК, см	СВР, г	УКР, %
ИУК	1,0	2,44±0,25	<b>0,43±0,05*</b>	5,69±0,08	<b>1,07±0,12**</b>	0,015±0,001	<b>43±3**</b>
	0,5	<b>3,14±0,18*</b>	<b>0,44±0,01**</b>	<b>7,49±0,17**</b>	<b>1,07±0,16**</b>	0,019±0,001	<b>50±7**</b>
	0,2	2,78±0,25	0,38±0,02	<b>7,33±0,55**</b>	<b>0,67±0,08**</b>	0,018±0,001	<b>45±3**</b>
ИМК	1,0	2,25±0,08	<b>0,43±0,03*</b>	6,23±0,26	<b>1,10±0,17**</b>	0,016±0,001	<b>39±5**</b>
	0,5	2,43±0,04	<b>0,44±0,01**</b>	5,93±0,34	<b>1,11±0,09**</b>	0,017±0,001	<b>32±2**</b>
	0,2	<b>3,14±0,36*</b>	<b>0,43±0,03*</b>	<b>7,68±0,18**</b>	<b>0,45±0,02*</b>	0,019±0,001	<b>60±3**</b>
ЭБ+ИУК	1,0	<b>3,88±0,28**</b>	<b>0,43±0,01*</b>	<b>7,98±0,52**</b>	0,10±0,03	<b>0,032±0,003**</b>	3±1
	0,5	<b>3,43±0,17**</b>	0,32±0,03	<b>7,52±0,11**</b>	0,11±0,01	<b>0,028±0,001**</b>	12±1
	0,2	<b>3,35±0,19**</b>	0,32±0,02	<b>7,34±0,59**</b>	0,13±0,01	<b>0,024±0,001**</b>	<b>17±1*</b>
НСР <sub>0,05</sub> (по факторам)		<b>0,41</b>	<b>0,05</b>	<b>0,62</b>	<b>0,17</b>	<b>0,003</b>	<b>6</b>
НСР <sub>0,01</sub> (по факторам)		<b>0,56</b>	<b>0,07</b>	<b>0,85</b>	<b>0,23</b>	<b>0,004</b>	<b>8</b>
НСР <sub>0,05</sub> (частные средние)		<b>0,70</b>	<b>0,08</b>	<b>1,07</b>	<b>0,29</b>	<b>0,005</b>	<b>11</b>
НСР <sub>0,01</sub> (частные средние)		<b>0,97</b>	<b>0,11</b>	<b>1,47</b>	<b>0,40</b>	<b>0,007</b>	<b>15</b>

Примечание – Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней; \* - значимо при  $P<0,05$ ; \*\* - значимо при  $P<0,01$ ; ВР – высота растений; ДлЗМ – длина третьего междоузлия; КЛ – количество листьев; ДК – длина корней; СВР – сырой вес регенерантов; УКР – укореняемость регенерантов *in vitro*; то же для таблицы 2

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов сорта Northland голубики высокой *in vitro*

ИВ	df	ВР		ДлЗМ		КЛ		ДК		СВР		УКР	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %								
Общее	26	0,374	-	0,004	-	0,919	-	0,212	-	0,000	-	360,648	-
Фактор А	2	<b>2,273**</b>	46,7	<b>0,015**</b>	29,9	<b>2,476**</b>	20,7	<b>1,918**</b>	69,6	<b>0,001**</b>	72,0	<b>3544,676**</b>	75,6
Фактор В	2	0,126	2,6	0,007	14,2	<b>1,512*</b>	12,6	<b>0,354**</b>	12,8	0,000	0,2	<b>357,176**</b>	7,6
АхВ	4	<b>0,571*</b>	23,5	0,004	17,4	<b>2,205**</b>	36,9	<b>0,116*</b>	8,4	<b>0,001*</b>	14,3	<b>230,787**</b>	9,8
Повторности	2	0,005	0,1	0,001	2,0	0,508	4,3	0,027	1,0	0,000	0,3	21,065	0,5
Случайные отклонения	16	0,165	27,1	0,002	36,5	0,380	25,5	0,028	8,2	0,000	13,2	37,992	6,5

Примечание – Прочерк «-» означает отсутствие данных; ИВ – источник варьирования; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – фитогормоны и их комбинации (ИУК, ИМК, ЭБ+ИУК); фактор В – концентрации фитогормонов (0,2; 0,5; 1,0 мг/л питательной среды на основе WPM)

Концентрация фитогормона, как фактор, оказывала достоверное (при  $P<0,05$  и  $P<0,01$ ) влияние на изменчивость длины корней, количества листьев у регенерантов, а также на изменчивость укореняемости регенерантов *in vitro* (табл. 2).

Комбинация двух исследуемых факторов оказывала достоверное (чаще, при  $P<0,05$ ) влияние на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением длины третьего междоузлия у регенерантов (табл. 2).

**Выводы.** Установлено, что присутствие в составе питательной среды 24-эпибрасинолида (в комбинации с ИУК) приводит к существенному и достоверному (при  $P<0,01$ ) увеличению показателей высоты регенерантов в 1,2-1,7 раза, количества листьев – в 1,3-1,5 раза, сырого веса регенерантов – в 1,3-2,1 раза. При этом величина признака находится в прямо пропорциональной зависимости от концентрации 24-эпибрасинолида. Установлено, что в присутствии 24-эпибрасинолида наблюдается увеличение количества междоузлий, но уменьшается их длина.

На питательных средах с ИМК наблюдается обратно пропорциональная зависимость показателей высоты регенерантов, количества листьев и сырого веса регенерантов от концентрации фитогормона.

На питательных средах с ИУК, при повышении концентрации фитогормона до 0,5 мг/л, показатели всех исследуемых признаков увеличиваются, при дальнейшем повышении концентрации ИУК до 1,0 мг/л – уменьшаются.

Наиболее высокие показатели укореняемости регенерантов сорта Northland голубики высокой *in vitro* получены на питательных средах с 0,2 мг/л ИМК (60%); 0,5 мг/л ИУК (50%) и 0,2 мг/л ИУК (45%).

Установлено, что в присутствии 24-эпибрасинолида формирование корней у регенерантов прекращается. При этом наблюдалась закономерность снижения частоты формирования корней у регенерантов *in vitro* при повышении концентрации 24-эпибрасинолида в составе питательной среды.

Наиболее длинные корни формировались у регенерантов на питательных средах с ИУК, либо ИМК в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л.

Установлено, что различающиеся по фитогормональному составу питательные среды оказывают высоко достоверное (при  $P<0,01$ ) влияние на изменчивость всех анализируемых признаков. Комбинация двух исследуемых факторов – фитогормон и его концентрация – оказывала достоверное (чаще, при  $P<0,05$ ) влияние на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением длины третьего междоузлия у регенерантов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова. – Минск : Беларус. наука, 2007. – 442 с.
2. Волотович, А.А. Результаты деятельности НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО “Полесский государственный университет” как модель развития прикладной биотехнологии на базе ВУЗа : материалы V Междунар. науч.-практ. конф. «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы», Пинск, 28-29 апреля 2011 г. / А.А. Волотович. – Пинск, 2011. – Ч. I. – С. 286 – 288.
3. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Минск, 1996. – 246 с.
4. Triggiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Triggiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
5. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
6. Боровиков, В.П. STATISTICA : искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб : Питер, 2001. – 688 с.
7. Анощенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.
8. Khripach, V.A. Brassinosteroids. A new class of plant hormones / V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, A.E. Groot. – San Diego: Academic Press, 1999. – 450 p.
9. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микроклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // Плодоводство. – 2007. – Т. 19. – С. 209 – 216.

**VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS  
AT REGENERANTS OF VACCINIUM CORYMBOSUM L. IN VITRO  
ON MEDIUM DIFFERENT BY HORMONAL STRUCTURE**

*O.A. KUDRYASHOVA, L.S. TSVIRKO, A.A. VOLOTOVICH*

*Summary*

There are presented the results of the comparative analysis of variability of six bio-production parameters *in vitro* at Northland high-bush blueberry regenerants on nutritious medium differing under the maintenance of phytohormones – IAA, IBA, and also 24-epibrassinolide – in concentration of 0.2; 0.5 or 1.0 mg per liter. It is established that the presence of 24-epibrassinolide (combined with IAA) leads to essential increase of height in 1.2-1.7 times, quantities of leaves – in 1.3-1.5 times, weight – in 1,3-2,1 times. Thus the sign size is in directly proportional dependence on concentration of 24-epibrassinolide. It is established that at presence of 24-epibrassinolide formation of roots stops. The highest indicators of rooting percent *in vitro* are received on nutrient mediums, contained IBA in concentration of 0.2 mg per liter, as well as IAA in concentrations of 0.5 or 0.2 mg per liter. At concentration increase of 24-epibrassinolide the frequency of *in vitro* root formation decreases. Results of the two-factorial dispersive analysis of phytohormones effects on variability of investigated quantitative traits at regenerants *in vitro* are discussed.

© Кудряшова О.А., Цвирко Л.С., Волотович А.А.

*Поступила в редакцию 11 октября 2011г.*