

УДК 57.085:634.73:547-314

О. А. КУДРЯШОВА<sup>1</sup>, А. А. ВОЛОТОВИЧ<sup>1</sup>, Е. П. ГЛЕБ<sup>1</sup>, Е. В. САХВОН<sup>1</sup>, П. С. МИНИН<sup>2</sup>,  
Р. П. ЛИТВИНОВСКАЯ<sup>2</sup>, В. А. ХРИПАЧ<sup>2</sup>

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ  
*VACCINIUM CORYMBOSUM IN VITRO* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИТОСТЕРОИДОВ**

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, e-mail:volant777@.tut.by,

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 31.01.2013)

**Введение.** Брассиностероиды (БС) являются перспективной группой природных регуляторов роста растений [1]. Наиболее изученным биологическим эффектом БС является их способность стимулировать рост растений. Известны такие эффекты БС, как удлинение клеток, ускорение роста междоузлий, стимулирование клеточного деления, клеточного роста, накопление биомассы, воздействие на воспроизведение, созревание и старение растений, урожай семян, дифференцировку элементов ксилемы. Кроме того, БС способны влиять на электрические свойства мембран, их проницаемость, структуру, стабильность и активность мембранных ферментов. БС оказывают влияние на метаболизм белков и нуклеиновых кислот [2–7], а также на стрессовый ответ и устойчивость к болезням [8–14]. БС стимулируют различные физиологические процессы в растительных клетках, включающие изменение фотосинтетической и ферментативной активности, баланса фитогормонов [15]. В действии БС на рост и развитие растений отмечены также эффекты синергизма с другими фитогормонами, в частности с ауксинами [16]. Регуляция роста и дифференцировки растительных клеток, опосредованная БС, приводит к усилению реакции геотропизма, удлинению стебля, ускорению развития листа и роста пыльцевой трубки, повышению жизнеспособности пыльцы, задержке старения листьев и повышению устойчивости растений к стрессам [17, 18]. Конечный эффект БС напрямую зависит от стадии развития растения и времени применения БС.

Сильный синергизм между ауксинами и БС наблюдали некоторые исследователи [19–24]. Доказано, что такой эффект зависит от последовательности обработок и появляется только в случаях, когда обработке БС предшествует обработка ауксином. Один из самых чувствительных тестов на БС основан на увеличении индуцируемого ауксином изгиба первого междоузлия боба [25]. Данные последних лет [16] 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.

Еще одно доказательство синергизма между БС и ауксином было получено в исследованиях продукции этилена этиолированными сегментами гипокотилей маша [21, 26–29]. Было показано, что брассинолид воздействует на продукцию этилена на стадии трансформации *s*-аденозилметионина до аминокислоты пропан-1-карбоновой кислоты [30] и что их эффекты на продукцию этилена могут ингибироваться применением фузикоцина, (аминоокси)-уксусной кислоты и некоторыми другими антагонистами ауксина [31].

Существуют данные по воздействию БС на уровень эндогенной АБК [32], ИУК [33], ИУК и ИМК [34], ГА<sub>3</sub> и АБК [35]. При изучении совместного действия БС и ГА<sub>3</sub> доказана независимая роль обоих фитогормонов в растении [36]. При использовании брассинолида в комбинации с этиленом на колеоптилях риса наблюдался аддитивный рост-стимулирующий эффект [37]. Некоторыми авторами было показано, что БС изменяют состав цитокининов в листьях растений [32].

Анализ изменчивости биопродукционных параметров у регенерантов голубики высокой сорта Brigitta blue 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 соотношениях 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). В нашем исследовании установлено, что применение экзогенного ЭБ в составе агаризованной питательной среды на микро-, макросолевой 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 [38]. Направленность действия ауксинов и БС зависит от их концентрации. В низких концентрациях фитогормоны проявляют стимулирующее действие, в высоких – ингибирующее.

Эффекты БС на корнеобразование противоречивы [39–45]. Для культивируемых вырезанных корней наблюдалось главным образом угнетение роста, тогда как у черенков и проростков, где присутствовали побеговые ткани, чаще имело место ускорение роста, особенно когда обработка проводилась через надземные ткани [35].

Голубика высокая – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Беларуси [46]. Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* рассматривается как один из основных промежуточных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах. Поэтому представляет особый интерес оптимизация этапа укоренения голубики высокой *in vitro*, а также изучение эффектов БС на данном этапе.

В настоящей статье приведены результаты сравнительного анализа изменчивости восьми количественных признаков у регенерантов двух сортов голубики высокой *in vitro* на питательных, агаризованных средах для укоренения, с органическими соединениями, на макро-, микросолевой основе ½ WPM, содержащих фитогормональные стероиды в сочетании и в разных комбинациях с 3-индолилуксусной кислотой (ИУК).

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

В качестве объекта исследования использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты из трех метамеров) сортов Northland и Patriot голубики высокой *V. corymbosum* L. Общее количество анализируемых регенерантов каждого сорта, для каждого варианта опыта и контроля составило не менее 150 шт. (пять стеклянных емкостей, по 30 регенерантов в каждой).

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-, макросолевой основе, с органическими соединениями (кроме фитогормонов) по WPM [47, 48], содержащей фитогормоны, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

1. Контроль – без фитогормонов;
2. 0,2 мг/л ИУК, совместно с 0,2 мг/л эпикастастерона (ЭК);
3. 0,5 мг/л ИУК, совместно с 0,5 мг/л ЭК;
4. 1,0 мг/л ИУК, совместно с 1,0 мг/л ЭК;
5. 0,2 мг/л ИУК, совместно с 0,2 мг/л ЭБ;
6. 0,5 мг/л ИУК, совместно с 0,5 мг/л ЭБ;
7. 1,0 мг/л ИУК, совместно с 1,0 мг/л ЭБ;
8. 0,2 мг/л эфира ЭБ и ИУК;
9. 0,5 мг/л ЭБ-ИУК;
10. 1,0 мг/л ЭБ-ИУК;

11. 0,2 мг/л эфира ЭК-ИУК;
12. 0,5 мг/л ЭК-ИУК;
13. 1,0 мг/л ЭК-ИУК
14. 0,2 мг/л ИУК;
15. 0,5 мг/л ИУК;
16. 1,0 мг/л ИУК.

Учет анализируемых признаков (высота регенерантов, длина третьего междоузлия, количество побегов, количество листьев, длина корней, сырой вес регенеранта, укореняемость регенерантов и жизнеспособность 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 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), относительной влажности воздуха 70 %.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [49] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [50]. 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 [51].

**Результаты и их обсуждение.** Результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у регенерантов сортов Northland и Patriot *in vitro* приведены в табл. 1 и 2 соответственно. Общий анализ изменчивости признаков указывает на то, что у сорта Northland (в отличие от сорта Patriot) по всем анализируемым признакам, за исключением укореняемости регенерантов, длины корней и жизнеспособности эксплантов, наблюдалось достоверное превышение показателей по отдельным вариантам опыта над контрольными значениями.

Т а б л и ц а 1. **Изменчивость количественных признаков у регенерантов сорта Northland голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L.**

Вариант опыта	ВР, см	ДЗМ, см	КП, шт.	КЛ, шт.	СВР, г	УР, %	ДК, см	ЖЭ, %
WPM (контроль)	1,69±0,01	0,42±0,01	1,01±0,01	4,37±0,05	0,0205±0,0002	92,93±0,09	0,81±0,02	96,43±1,94
WPM+ ЭК <sub>0,2</sub> +УК <sub>0,2</sub>	<b>2,13±0,12*</b>	0,37±0,03	1,07±0,01	<b>5,07±0,07**</b>	0,0207±0,0008	<b>66,73±8,74**</b>	0,57±0,05	97,73±1,13
WPM+ ЭК <sub>0,5</sub> +УК <sub>0,5</sub>	1,59±0,09	0,35±0,01	1,09±0,03	4,08±0,25	0,0208±0,0005	<b>38,73±10,28**</b>	0,72±0,11	<b>79,77±3,24**</b>
WPM+ ЭК <sub>1,0</sub> +УК <sub>1,0</sub>	1,75±0,07	0,39±0,02	1,04±0,02	4,01±0,15	0,0223±0,0003	<b>42,73±11,64**</b>	0,49±0,03	<b>82,23±3,99**</b>
WPM+ ЭБ <sub>0,2</sub> +УК <sub>0,2</sub>	<b>2,95±0,27**</b>	<b>0,50±0,09*</b>	<b>1,11±0,04*</b>	<b>5,49±0,14**</b>	0,0235±0,0019	<b>29,93±8,22**</b>	0,53±0,17	97,77±2,23
WPM+ ЭБ <sub>0,5</sub> +УК <sub>0,5</sub>	<b>2,63±0,21**</b>	<b>0,59±0,03**</b>	<b>1,17±0,04**</b>	<b>5,23±0,16**</b>	0,0233±0,0009	<b>16,30±4,73**</b>	<b>0,32±0,09**</b>	88,90±4,02
WPM+ ЭБ <sub>1,0</sub> +ИУК <sub>1,0</sub>	<b>2,48±0,13**</b>	<b>0,53±0,06**</b>	1,08±0,04	<b>5,09±0,08**</b>	<b>0,0263±0,0008**</b>	<b>29,30±7,78**</b>	<b>0,31±0,10**</b>	91,10±1,10
WPM+ ЭБ-ИУК <sub>0,2</sub>	<b>2,14±0,18**</b>	0,43±0,02	1,07±0,05	4,69±0,26	0,0207±0,0011	62,00±4,11	0,71±0,08	91,13±2,94
WPM+ ЭБ-ИУК <sub>0,5</sub>	<b>2,42±0,15**</b>	0,44±0,02	1,06±0,01	<b>5,36±0,16**</b>	0,0224±0,0009	84,37±3,12	<b>0,42±0,02*</b>	92,20±1,10
WPM+ ЭБ-ИУК <sub>1,0</sub>	<b>2,42±0,19**</b>	<b>0,55±0,03**</b>	<b>1,23±0,09**</b>	<b>4,99±0,24*</b>	0,0196±0,0009	<b>34,63±8,95**</b>	0,74±0,19	92,23±2,94
WPM+ ЭК-ИУК <sub>0,2</sub>	<b>2,41±0,19**</b>	0,40±0,01	1,02±0,01	<b>5,84±0,25**</b>	0,0250±0,0009*	83,43±3,19	0,61±0,05	92,87±5,48
WPM+ ЭК-ИУК <sub>0,5</sub>	1,79±0,04	0,41±0,04	1,04±0,02	<b>5,11±0,11**</b>	0,0231±0,0008	<b>76,70±1,74**</b>	0,57±0,09	<b>85,53±2,23*</b>
WPM+ ЭК-ИУК <sub>1,0</sub>	1,74±0,06	0,39±0,01	<b>1,17±0,03**</b>	4,52±0,19	0,0213±0,0013	<b>68,87±0,24**</b>	0,48±0,08	<b>73,33±6,96**</b>

Вариант опыта	ВР, см	ДЗМ, см	КП, шт.	КЛ, шт.	СВР, г	УР, %	ДК, см	ЖЭ, %
WPM+ИУК <sub>0,2</sub>	<b>2,38±0,12**</b>	<b>0,51±0,02*</b>	<b>1,10±0,06*</b>	<b>5,17±0,18**</b>	<b>0,0292±0,0006**</b>	90,30±5,78	<b>1,26±0,04**</b>	<b>57,77±12,38**</b>
WPM+ИУК <sub>0,5</sub>	<b>2,39±0,14**</b>	<b>0,53±0,04**</b>	1,05±0,04	<b>4,97±0,29*</b>	0,0226±0,0006	92,40±3,90	<b>1,28±0,09**</b>	88,90±1,10
WPM+ИУК <sub>1,0</sub>	<b>2,82±0,14**</b>	<b>0,59±0,03**</b>	1,04±0,02	<b>5,44±0,08**</b>	<b>0,0247±0,0008*</b>	92,03±2,77	<b>1,48±0,18**</b>	87,77±5,53
НСР <sub>0,05</sub>	0,34	0,07	0,08	0,49	0,0038	12,21	0,33	10,45
НСР <sub>0,01</sub>	0,45	0,09	0,10	0,65	0,0050	16,12	0,43	13,80

Примечания. Данные представлены как среднее арифметическое±стандартная ошибка средней. Признаки: ВР – высота регенеранта, ДЗМ – длина третьего междоузлия, КП – количество побегов, КЛ – количество листьев, СВР – сырой вес регенеранта, УР – процент укорененных регенерантов (укореняемость регенерантов), ДК – длина корней, ЖЭ – жизнеспособность эксплантов. Варианты опыта (индекс обозначает концентрацию в мг/л): WPM – микро-, макросолевая основа питательной среды для древесных растений; ЭК – эпикастастерон, ЭБ – 24-эпибрассинолид, ИУК – 3-индолилуксусная кислота, ЭК-ИУК – гибридная молекула, эфир ЭК и ИУК; ЭБ-ИУК – гибридная молекула, эфир ЭБ и ИУК. НСР<sub>0,05</sub> – наименьшая существенная разница при  $P<0,05$ ; НСР<sub>0,01</sub> – наименьшая существенная разница при  $P<0,01$ . Полужирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от значения в контроле.

\*Достоверно отличается от контроля при  $P<0,05$ .

\*\* При  $P<0,01$ .

Т а б л и ц а 2. Изменчивость количественных признаков у регенерантов сорта Patriot голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L.

Вариант опыта	ВР, см	ДЗМ, см	КП, шт.	КЛ, шт.	СВР, г	УР, %	ДК, см	ЖЭ, %
WPM (контроль)	2,28±0,02	0,55±0,01	1,26±0,01	5,84±0,09	0,0306±0,0007	57,60±6,07	1,56±0,44	64,20±0,90
WPM+ЭК <sub>0,2</sub> +ИУК <sub>0,2</sub>	2,49±0,15	<b>0,39±0,01**</b>	<b>1,14±0,04**</b>	5,62±0,31	<b>0,0263±0,0007*</b>	46,93±4,40	<b>0,71±0,04**</b>	<b>84,43±5,57**</b>
WPM+ЭК <sub>0,5</sub> +ИУК <sub>0,5</sub>	2,10±0,19	<b>0,37±0,03**</b>	<b>1,11±0,04**</b>	<b>5,19±0,23*</b>	<b>0,0247±0,0009**</b>	<b>15,83±1,2**</b>	<b>0,76±0,16**</b>	70,00±1,91
WPM+ЭК <sub>1,0</sub> +ИУК <sub>1,0</sub>	2,50±0,39	<b>0,47±0,03*</b>	<b>1,06±0,04**</b>	5,39±0,47	<b>0,0262±0,0024*</b>	<b>35,73±3,22**</b>	<b>0,28±0,04**</b>	72,20±4,85
WPM+ЭБ <sub>0,2</sub> +ИУК <sub>0,2</sub>	<b>2,99±0,15**</b>	0,61±0,04	<b>1,16±0,02*</b>	5,89±0,25	<b>0,0233±0,0024**</b>	<b>27,70±7,11**</b>	<b>0,45±0,04**</b>	<b>94,43±2,94**</b>
WPM+ЭБ <sub>0,5</sub> +ИУК <sub>0,5</sub>	<b>2,66±0,19*</b>	0,50±0,08	1,19±0,06	5,51±0,11	<b>0,0256±0,0008*</b>	<b>10,87±3,32**</b>	<b>0,36±0,09**</b>	<b>90,00±1,91**</b>
WPM+ЭБ <sub>1,0</sub> +ИУК <sub>1,0</sub>	2,53±0,15	0,49±0,04	<b>1,17±0,07*</b>	<b>5,23±0,33*</b>	<b>0,0247±0,0009**</b>	<b>15,03±0,90**</b>	<b>0,28±0,09**</b>	<b>81,10±4,85**</b>
WPM+ЭБ-ИУК <sub>0,2</sub>	2,55±0,33	0,52±0,06	<b>1,06±0,03**</b>	<b>5,29±0,19*</b>	<b>0,0254±0,0048**</b>	<b>71,60±5,84*</b>	<b>0,85±0,05**</b>	<b>81,10±6,75**</b>
WPM+ЭБ-ИУК <sub>0,5</sub>	<b>3,17±0,12**</b>	0,49±0,02	1,27±0,05	5,63±0,19	<b>0,0247±0,0019**</b>	58,80±4,45	<b>0,59±0,07**</b>	<b>94,43±1,13**</b>
WPM+ЭБ-ИУК <sub>1,0</sub>	2,25±0,20	0,48±0,08	1,27±0,06	5,67±0,69	<b>0,0226±0,0008**</b>	<b>10,77±3,30**</b>	1,28±0,31	<b>81,10±2,20**</b>
WPM+ЭК-ИУК <sub>0,2</sub>	2,23±0,13	<b>0,43±0,01**</b>	<b>1,10±0,05**</b>	6,03±0,30	0,0294±0,0009	<b>43,80±4,78*</b>	<b>1,18±0,09*</b>	67,77±9,68
WPM+ЭК-ИУК <sub>0,5</sub>	1,98±0,11	<b>0,46±0,02*</b>	<b>1,17±0,04*</b>	5,97±0,16	0,0281±0,0091	<b>32,67±9,93**</b>	<b>0,76±0,10**</b>	<b>80,03±6,67**</b>
WPM+ЭК-ИУК <sub>1,0</sub>	<b>1,75±0,01**</b>	<b>0,45±0,01**</b>	1,21±0,03	<b>5,32±0,11*</b>	<b>0,0206±0,0011**</b>	<b>24,93±5,45**</b>	<b>0,80±0,14**</b>	<b>80,00±1,91**</b>
WPM+ИУК <sub>0,2</sub>	2,26±0,11	0,58±0,02	<b>1,07±0,02**</b>	<b>5,35±0,16*</b>	<b>0,0259±0,0024*</b>	<b>76,30±7,33**</b>	1,36±0,03	74,43±5,57
WPM+ИУК <sub>0,5</sub>	<b>2,63±0,25*</b>	0,61±0,03	<b>1,01±0,01**</b>	5,86±0,40	<b>0,0242±0,0013**</b>	<b>79,00±1,05**</b>	1,41±0,12	<b>80,00±5,09**</b>
WPM+ИУК <sub>1,0</sub>	2,11±0,21	0,53±0,01	<b>1,02±0,02**</b>	<b>4,98±0,27**</b>	<b>0,0263±0,0018*</b>	60,30±2,42	1,85±0,18	<b>95,57±2,94**</b>
НСР <sub>0,05</sub>	0,34	0,07	0,08	0,49	0,0038	12,21	0,33	10,45
НСР <sub>0,01</sub>	0,45	0,09	0,10	0,65	0,0050	16,12	0,43	13,80

Анализ высоты регенерантов сорта Northland указывает на то, что характер изменчивости признака определяется присутствием в составе питательной, агаризованной среды ЭБ и ЭК (табл. 1). С ростом концентрации ИУК в составе питательной среды (варианты 14–16, табл. 1) при отсутствии ЭБ и ЭК, высота регенерантов достоверно увеличивалась в 1,4–1,7 раза по сравнению с контролем. Данная закономерность сохранялась в случае использования гибридной молекулы ЭБ-ИУК (варианты 8–10). При этом с ростом концентрации ЭБ-ИУК высота регенерантов достоверно увеличивалась в 1,3–1,4 раза (табл. 1). Во всех остальных случаях (варианты 2–4, 5–7, 11–13) наиболее высокие значения анализируемого признака – в 1,3–1,8 раз достоверно превышающие контрольные показатели – наблюдались в вариантах с наименьшим содержанием комбинаций фитогормонов (по 0,2 мг/л). При увеличении концентрации фитогормонов в приведенных сочетаниях и комбинациях наблюдалось снижение показателей высоты регенерантов (табл. 1). Та же закономерность прослеживается у сорта Patriot (табл. 2).

Следует отметить, что наиболее высокие показатели высоты регенерантов сорта Northland получены при сочетании ИУК и ЭБ (варианты 5–7, табл. 1). Несмотря на то что при сочетании ИУК и ЭБ в равных концентрациях, с ростом концентраций от 0,2–1,0 мг/л происходило снижение показателей признака, полученные результаты превышали показатели в контроле в 1,5–1,8 раза (табл. 1). Та же закономерность установлена для регенерантов сорта Patriot (табл. 2), при этом достоверное превышение высоты регенерантов над показателями в контроле составило 1,2–1,3 раза (варианты 5–7, табл. 2).

Анализ длины третьего междоузлия у регенерантов сортов Northland (табл. 1) и Patriot (табл. 2) устанавливает прямо пропорциональную зависимость величины признака от концентрации ИУК (варианты 14–16). При этом с увеличением концентрации ИУК показатели признака у регенерантов сорта Northland достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) увеличиваются в 1,2–1,4 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Та же зависимость наблюдалась при сочетании ИУК и ЭБ в равных концентрациях (варианты 5–7; табл. 1, 2), а также при использовании гибридной молекулы ЭБ-ИУК (варианты 8–10, табл. 1). При этом достоверное превышение показателей признака у регенерантов сорта Northland по сравнению с контролем составило 1,2–1,4 раза и 1,3 раза соответственно (табл. 1). С увеличением концентраций ИУК и ЭБ от 0,5–1,0 мг/л (варианты 6–7, табл. 1) наблюдалось некоторое снижение показателей признака. Та же тенденция уменьшения показателей длины третьего междоузлия с ростом концентраций ЭБ и ИУК (в сочетании), ЭБ-ИУК характерна и для регенерантов сорта Patriot (варианты 5–10, табл. 2).

В присутствии ЭК в составе питательной среды как в сочетании с ИУК в равных концентрациях, так и в составе гибридной молекулы ЭК-ИУК происходило уменьшение длины третьего междоузлия по сравнению с контрольными показателями (варианты 2–4, 11–13; табл. 1, 2). При этом у регенерантов сорта Patriot показатели признака по сравнению с контролем были достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) ниже в 1,2–1,5 раза во всех указанных вариантах (табл. 2). Следует также отметить различные тенденции характера изменчивости длины третьего междоузлия у регенерантов обоих исследуемых сортов в зависимости от способа применения ЭК. Так, при сочетании ЭК и ИУК в равных концентрациях с увеличением концентраций фитогормонов от 0,2–0,5 мг/л показатели признака уменьшаются, а при дальнейшем увеличении концентраций от 0,5–1,0 мг/л – растут (варианты 2–4; табл. 1, 2). При использовании же ЭК в составе гибридной молекулы ЭК-ИУК, напротив, с увеличением концентрации ЭК-ИУК от 0,2–0,5 мг/л показатели признака растут, а при дальнейшем увеличении концентрации от 0,5–1,0 мг/л – падают (варианты 11–13; табл. 1, 2).

По количеству побегов регенеранты сорта Northland во всех случаях превышали показатели в контроле (табл. 1). Наиболее высокое превышение (в 1,2 раза), достоверное при  $P < 0,01$  по данному признаку, наблюдалось в вариантах с 1,0 мг/л ЭБ-ИУК; 1,0 мг/л ЭК-ИУК; по 0,5 мг/л ЭБ и ИУК.

В исследуемых вариантах опыта у регенерантов сорта Patriot, напротив, в подавляющем большинстве случаев наблюдалось достоверное при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$  снижение в 1,1–1,3 раза показателей количества побегов по сравнению с контролем (табл. 2). Несущественное превышение контрольного показателя наблюдалось только в вариантах опыта с 0,5 мг/л ЭБ-ИУК и 1,0 мг/л ЭБ-ИУК (табл. 2).

По количеству листьев у регенерантов сорта Northland при совместном использовании ЭК (либо ЭБ) с ИУК (варианты 2–7), а также в вариантах с ЭК-ИУК (варианты 11–13) установлено закономерное снижение показателей признака с ростом концентрации указанных фитогормонов (табл. 1). При этом достоверное превышение по отношению к контролю составляло 1,2–1,3 раза. При использовании только ИУК в составе питательной среды у регенерантов во всех случаях наблюдалось достоверное превышение показателей по сравнению с контролем. При этом с ростом концентрации ИУК от 0,2 до 0,5 мг/л показатели признака уменьшались, а при дальнейшем увеличении концентраций ИУК от 0,5 до 1,0 мг/л – возрастали (варианты 14–16, табл. 1).

У регенерантов сорта Patriot в вариантах опыта количество листьев в подавляющем большинстве случаев было меньше, чем в контроле (табл. 2). Достоверное снижение по сравнению с контролем при этом составляло 1,1–1,2 раза. По разному изменялись показатели признака в зависимости от структуры применяемых фитогормонов. Так, при использовании ЭБ и ИУК с ростом концентрации фитогормонов от 0,2 до 1,0 мг/л наблюдалась тенденция уменьшения показателей признака (варианты 5–7, табл. 2), в то время как с ростом концентрации ЭБ-ИУК от 0,2 до 1,0 мг/л показатели признака увеличивались (варианты 8–10, табл. 2).

Во всех случаях, за исключением варианта 10 с 1,0 мг/л ЭБ-ИУК, у сорта Northland наблюдалось превышение показателей сырого веса регенерантов по сравнению с контролем (табл. 1). Достоверное превышение в 1,2–1,4 раза наблюдалось только в четырех вариантах опыта (в порядке возрастания – вариант 16 с 1,0 мг/л ИУК; вариант 11 с 0,2 мг/л ЭК-ИУК; вариант 7 с 1,0 мг/л ЭБ и 1,0 мг/л ИУК; вариант 14 с 0,2 мг/л ИУК, табл. 1). При совместном использовании ЭК (либо ЭБ) и ИУК с ростом концентраций фитогормонов от 0,2 до 1,0 мг/л происходило увеличение показателей сырого веса регенерантов, в то время как с ростом концентрации ЭК-ИУК – показатели признака уменьшались (табл. 1).

У сорта Patriot закономерно наблюдалось снижение сырого веса регенерантов во всех вариантах опыта по сравнению с контролем (табл. 2). При этом достоверное снижение показателей в зависимости от варианта опыта, составляло 1,2–1,5 раза. С увеличением концентраций ЭК и ИУК от 0,2 до 1,0 мг/л при совместном их использовании (либо при использовании только ИУК) показатели признака сначала снижались, а затем возрастали до прежнего уровня (варианты 2–4, табл. 2). С увеличением концентраций ЭБ и ИУК от 0,2 до 1,0 мг/л наблюдались противоположные эффекты роста и уменьшения показателей признака (варианты 5–7, табл. 2). В то же время с ростом концентраций ЭБ-ИУК либо ЭК-ИУК от 0,2 до 1,0 мг/л (варианты 8–13, табл. 2) показатели признака уменьшались.

Анализ укореняемости регенерантов сорта Northland указывает на снижение показателей признака во всех вариантах опыта по отношению к контролю (табл. 1). При этом сочетание ЭБ (либо ЭК) и ИУК во всех исследуемых концентрациях приводило к достоверному снижению показателей признака в 1,4–5,7 раза (варианты 2–7, табл. 1). В целом применение ЭБ либо ЭК приводило к снижению, в большинстве случаев достоверному, укореняемости регенерантов в 1,2–5,7 раза (варианты 2–7, 8, 10, 12–13, табл. 1). При использовании ИУК укореняемость регенерантов была на уровне данных в контроле.

У сорта Patriot во всех случаях, за исключением варианта 8 с 0,2 мг/л ЭБ-ИУК, присутствие в составе среды ЭБ либо ЭК приводило к снижению (в большинстве случаев достоверному при  $P < 0,01$ ) укореняемости регенерантов по отношению к контролю в 1,3–5,3 раза (варианты 3–7, 10–13, табл. 2). При использовании 0,2 мг/л ЭБ-ИУК укореняемость регенерантов по сравнению с контролем достоверно при  $P < 0,05$  увеличивалась в 1,2 раза (табл. 2). При использовании только ИУК укореняемость регенерантов была достоверно при  $P < 0,01$  выше в 1,3–1,4 раза по сравнению с данными в контроле (варианты 14–15, табл. 2).

Анализ длины корней у регенерантов исследуемых сортов Northland и Patriot согласуется с данными по укореняемости регенерантов (табл. 1, 2). В присутствии ЭБ либо ЭК (в том числе в составе эфира) наблюдалось (в большинстве случаев достоверное при  $P < 0,01$ ) уменьшение в 1,8–5,8 раза показателей признака по сравнению с контролем. В присутствии ИУК у сорта Northland наблюдалось достоверное превышение (увеличивающееся с ростом концентрации ИУК) величины признака в 1,6–1,8 раза (варианты 14–16, табл. 1).

Анализ изменчивости жизнеспособности эксплантов у сорта Northland указывает на то, что в большинстве вариантов опыта показатели были на уровне контрольных (табл. 1). Достоверное снижение в 1,1–1,3 раза показателей по сравнению с контролем наблюдалось при использовании ЭК и ИУК в концентрациях по 0,5 и 1,0 мг/л (варианты 3–4, табл. 1) и ЭК-ИУК в тех же концентрациях (варианты 12–13, табл. 1). Достоверное снижение жизнеспособности эксплантов в 1,7 раза по сравнению с контролем наблюдалось при использовании 0,2 мг/л ИУК (вариант 14, табл. 1).

У сорта Patriot во всех без исключения вариантах опыта наблюдалось повышение жизнеспособности эксплантов по сравнению с контролем (табл. 2), в большинстве случаев достоверное при  $P < 0,01$  превышение в 1,2–1,5 раз (варианты 2, 5–10, 12–13, 15–16, табл. 2). С ростом концентрации ИУК от 0,2 до 1,0 мг/л наблюдалось существенное увеличение жизнеспособности эксплантов (варианты 14–16, табл. 2), в то время как в присутствии ЭК (либо ЭБ) и ИУК с ростом концентраций фитогормонов наблюдалось уменьшение показателей признака (варианты 2–7, табл. 2).

Сравнительный анализ данных, приведенных в табл. 1 и 2, указывает на существование четких генотипических различий между исследуемыми сортами голубики высокой по вариантам опыта. Двухфакторный дисперсионный анализ установил достоверное (в большинстве случаев при  $P < 0,01$ ) влияние генотипа на изменчивость всех анализируемых признаков, с долей влияния 4–27 % (табл. 3). При этом установлена наиболее высокая доля влияния генотипа на изменчивость жизнеспособности эксплантов (17,5 %), количества листьев (27,1 %), укореняемости растений и количества побегов у регенеранта (по 16,6 %), сырого веса регенеранта (14,6 %).

Для фактора фитогормональный состав среды установлено достоверное при  $P < 0,01$  влияние на изменчивость высоты регенерантов (с долей влияния фактора 55,7 %), длины третьего междоузлия (43,1 %), количества побегов (32,2 %), количества листьев (31,6 %), укореняемости регенерантов (60,6 %), длины корней (38,4 %) и жизнеспособности эксплантов (33,5 %) (табл. 3).

Совокупность исследуемых факторов оказывала достоверное при  $P < 0,01$  влияние на изменчивость укореняемости регенерантов (с долей влияния 9,8 %) и жизнеспособности эксплантов (21,1 %) (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов сортовой голубики высокой *in vitro*

ИВ	df	ВР		ДЗМ		КП		КЛ	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	77	0,234	100,0	0,008	100,0	0,009	100,0	0,425	100,0
Фактор А	1	<b>1,300**</b>	7,2	<b>0,022*</b>	3,6	<b>0,119**</b>	16,6	<b>8,861**</b>	27,1
Фактор В	12	<b>0,836**</b>	55,7	<b>0,022**</b>	43,1	<b>0,019**</b>	32,2	<b>0,864**</b>	31,6
А × В	12	0,162	10,8	0,007	13,4	0,009	14,6	0,290	10,6
Повторности	2	0,006	0,1	0,001	0,4	0,001	0,2	0,224	1,4
Случайные отклонения	50	0,095	26,2	0,005	39,5	0,005	36,4	0,192	29,3
Общее	77	0,001	100,0	680,695	100,0	0,170	100,0	124,129	100,0
Фактор А	1	<b>0,001**</b>	14,6	<b>8687,927**</b>	16,6	<b>0,772*</b>	5,9	<b>1673,560**</b>	17,5
Фактор В	12	0,000	16,1	<b>2647,564**</b>	60,6	<b>0,417**</b>	38,4	<b>267,177**</b>	33,5
А × В	12	0,000	11,7	<b>426,912**</b>	9,8	0,118	10,8	<b>167,857**</b>	21,1
Повторности	2	0,000	2,8	160,416	0,6	0,207	3,2	80,280	1,7
Случайные отклонения	50	0,000	54,8	130,220	12,4	0,109	41,7	50,068	26,2

П р и м е ч а н и е. ИВ – источник варьирования; df – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – сорта голубики высокой (Northland и Patriot); фактор В – фитогормональный состав среды на микро-, макросолевого основе WPM.

**З а к л ю ч е н и е.** Установлены различия по изменчивости анализируемых признаков в зависимости от фитогормонального состава среды. При одновременном использовании ЭБ и ИУК с ростом концентрации фитогормонов в пределах 0,2–1,0 мг/л наблюдалось уменьшение величины высоты регенерантов, количества листьев и длины корней у обоих исследуемых сортов – Northland

и Patriot. В то же самое время при использовании эфира ЭБ-ИУК в тех же концентрациях тенденции изменчивости признаков либо отсутствовали вовсе, либо были противоположны. Анализ изменчивости исследуемых признаков на среде с ЭК также установил противоположные эффекты при одновременном использовании ЭК и ИУК в концентрациях 0,2–1,0 мг/л по сравнению с действием эфира ЭК-ИУК в тех же концентрациях. В большинстве случаев действие эфиров ЭК-ИУК и ЭБ-ИУК напоминало действие ИУК, применяемой самостоятельно в составах питательных сред.

Использование фитогормонов по сравнению с контролем чаще приводило к достоверному увеличению показателей высоты регенерантов в 1,2–1,8 раз (особенно в присутствии ЭБ как в составе эфира, так и при сочетании с ИУК в разных концентрациях), длины третьего междоузлия в 1,2–1,4 раза, количества побегов сырого веса регенерантов и количества листьев в 1,2–1,3 раза (только у сорта Northland), жизнеспособности эксплантов в 1,2–1,5 раза (только у сорта Patriot).

В подавляющем большинстве случаев присутствие фитогормональных стероидов ЭБ либо ЭК приводит к достоверному, существенному уменьшению в 1,2–5,7 раза показателей укореняемости регенерантов у обоих исследуемых сортов. Длина корней также (в большинстве случаев достоверно) уменьшается в 1,9–5,6 раза в присутствии ЭБ либо ЭК. По отношению к контролю достоверное превышение укореняемости регенерантов и длины корней в 1,3–1,4 раза и в 1,6–1,8 раза соответственно наблюдалось только в вариантах с ИУК, присутствующей самостоятельно в составах питательных сред.

Установлено достоверное (в большинстве случаев при  $P < 0,01$ ) влияние генотипа на изменчивость всех анализируемых признаков с долей влияния 4–27 %. Для фактора фитогормональный состав среды установлено достоверное при  $P < 0,01$  влияние на изменчивость практически всех (за исключением сырого веса регенеранта) признаков с долей влияния фактора 32–61 %. Совокупность исследуемых факторов оказывала достоверное при  $P < 0,01$  влияние только на изменчивость признаков укореняемости регенерантов и жизнеспособность эксплантов с долей влияния 10 и 21 % соответственно.

## Литература

1. Hayat S., Ahmad A. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. Berlin: Springer-Verlag, 2010.
2. Braun P., Wild A. // J. Plant Physiol. 1984. Vol. 116. P. 189–196.
3. Wang Y., Luo W., Zhao Y., Ikekawa N. // Zhiwu Shenglixue Tongxun. 1988. Vol. 1. P. 29–31.
4. Schilling G., Schiller C., Otto S. // Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications. ACS Symposium Series. 1991. Vol. 474. P. 208–219.
5. Mironenko A. V., Kandelinskaya O. L., Bushueva S. A., Uralskaya H. R. // Dokl. RAAS. 1996. Vol. 1. P. 11–13.
6. Mironenko A. V., Kandelinskaya O. L., Chekhova A. N. et al. Problems of experimental botany. Minsk, 1997.
7. Kandelinskaya O. L., Khripach V. A. // Int. Workshop. Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, Application. Halle, 1990. P. 46.
8. Deeva V. P., Sanko N. V., Vedenev A. N., Pavlova I. V. Problems of experimental botany. Minsk, 1997.
9. Katsumi M. // Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications. ACS Symposium Series. 1991. Vol. 474. P. 246–254.
10. Wilen R. W., Sacco M., Gusta L. V., Krishna P. // Physiol. Plant. 1995. Vol. 95. P. 195–202.
11. Hirai K., Fujii S., Honjo K. // Jpn. J. Crop Sci. 1991. Vol. 60. P. 29–35.
12. Kulaeva O. N., Burkhanova E. A., Fedina A. B. et al. // Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications. ACS Symposium Series. 1991. Vol. 474. P. 141–155.
13. Bokebayeva G. A., Khripach V. A. // Brassinosteroids – biorational, ecologically safe regulators of growth and productivity of plants. Minsk, 1993. P. 21.
14. Zhao Y.-J., Wu D. // Int. Workshop. Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, Application. Halle, 1990. P. 26.
15. Mussig C., Altmann T. // Plant Physiol. Biochem. 1999. Vol. 37. P. 363–372.
16. Hardtke Ch. S., Dorcey E., Osmont K. S., Sibout R. // Trends Cell Biol. 2007. Vol. 17. P. 485–492.
17. Yin Y., Wang Zh., Mora-Garcia S., Li J. et al. // Cell. 2002. Vol. 109. P. 181–191.
18. Yin Y., Vafeados D., Tao Y. et al. // Cell. 2005. Vol. 120. P. 249–259.
19. Yopp J. H., Mandava N. B., Sasse J. M. // Physiol. Plant. 1981. Vol. 53. P. 445–452.
20. Takeno K., Pharis, R. P. // Plant Cell Physiol. 1982. Vol. 23. P. 1275–1281.
21. Arteca R. N., Tsai D. S., Schlaghaufer C., Mandava N. B. // Physiol. Plant. 1983. Vol. 59. P. 539–544.
22. Meudt W. J., Thompson M. J. // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am. 1983. Vol. 10. P. 306–311.
23. Choi C.-D., Kim S.-C., Lee S.-K. // Korean J. Crop Sci. 1990. Vol. 35. P. 58–64.
24. Cao H., Chen S. // Plant Growth Regul. 1995. Vol. 16. P. 189–196.



25. Meudt W.J. // Plant. Physiol. 1987. Vol. 83. P. 195–198.
26. Arteca R. N. // Physiol. Plant. 1984. Vol. 62. P. 102–104.
27. Arteca R. N., Bachman J. M., Yopp J. H., Mandava N. B. // Physiol. Plant. 1985. Vol. 64. P. 13–16.
28. Schlagnhauer C. D., Arteca R. N. // Plant. Physiol. 1985. Vol. 77. P. 157.
29. Arteca R., Schlagnhauer C. // Physiol. Plant. 1984. Vol. 62. P. 445–447.
30. Schlagnhauer C., Arteca R. N., Yopp J. H. // Physiol. Plant. 1984. Vol. 61. P. 555–558.
31. Arteca R. N., Tsai D.-S., Mandava N. B. // J. Plant Physiol. 1991. Vol. 139. P. 52–56.
32. Kozick T. A., Kislin E. N. // Workshop on Brassinosteroids. 1991. P. 29–30.
33. Kurapov P. B. Hormonal balance in plants. Doctor of Sciences Degree Thesis. Moscow: Tymiryazev Agricultural Academy, 1996.
34. Luo B., Yu D., Zhou D. // Plant Physiol. Commun. 1988. P. 31–34.
35. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Groot A. E. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. San Diego: Academic Press, 1999.
36. Gregory L. E., Mandava N. B. // Physiol. Plant. 1982. Vol. 54. P. 239–243.
37. Zhou A.-Q. // Plant Physiol. Commun. 1987. P. 19–22.
38. Кудряшова О. А., Вологович А. А., Хрунач В. А. и др. Физиол. растен. 2012. Т. 59, № 4. С. 632–640.
39. Romani G., Marre M. T., Bonetti A. et al. // Physiol. Plant. 1983. Vol. 59. P. 528–532.
40. Cerana R., Spelta M., Bonetti A., Lado P. // Plant Sci. 1985. Vol. 38. P. 99–105.
41. Sathiyamoorthy P., Nakamura S. // Plant Growth Regul. 1990. Vol. 9. P. 73–76.
42. Guan M., Roddick J. G. // Physiol. Plant. 1988. Vol. 73. P. 426–431.
43. Roddick J. G., Rijnenberg A. L., Ikekawa N. // Physiol. Plant. 1993. Vol. 87. P. 453–458.
44. Roddick J. G. // Phytochemistry. 1994. Vol. 37. P. 1277–1281.
45. Wang S.-G., Deng R.-F. // J. Southwest Agric. Univ. 1992. Vol. 14. P. 177–181.
46. Рупасова Ж. А., Яковлев А. П. Фиторекультивация выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений севера Беларуси на основе возделывания ягодных растений семейства Ericaceae / Под ред. В. Н. Решетникова. Мн., 2011.
47. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Мн., 1996.
48. Trigiano R. N., Gray D. J. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. US/MA, CRC Press LLC. 1999–2000.
49. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М., 1985.
50. Боровиков В. П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере. СПб., 2001.
51. Анощенко Б. Ю. // Генетика. 1994. Т. 30. С. 8–9.

*O. A. KUDRYASHOVA, A. A. VOLOTOVICH, E. P. GLEB, E. V. SAKHVON,  
P. S. MININ, R. P. LITVINOVSKAIA, V. A. KHRIPACH*

#### **ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS AT REGENERANTS OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* IN VITRO UNDER THE ACTION OF PHYTOSTEROIDS**

##### **Summary**

Results of the comparative analysis of variability of 8 quantitative traits at regenerants of Northland and Patriot cultivars of highbush blueberry *in vitro* on nutrient, agarized mediums for rooting, with organic compounds, on macro- and micro- salt basis of ½ WPM differing on composition of phytohormonal steroids in a combination with IAA in 15 variants of experience are given in the present article. Usage of phytohormones in comparison with control led to authentic increase in indicators of regenerants height in 1.2–1.8 times; lengths of the third interstice in 1.2–1.4 times; the quantities of shoots, weight of regenerants and quantities of leaves in 1.2–1.3 times; explants viability in 1.2–1.5 times. In overwhelming majority of cases the presence of phytohormonal steroids – EB or EK – leads to authentic, essential rooting reduction in 1.2–5.7 times at both investigated cultivars. It is established the authentic (in most cases at  $P < 0.01$ ) influence of a genotype on variability of all analyzed traits, as well as the authentic at  $P < 0.01$  influence of phytohormonal structure of medium on variability of practically all traits (except for weight of regenerants).