

УДК 57.085:634.73:547-314

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

### ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM IN VITRO* ПОД ВЛИЯНИЕМ РЕГУЛЯТОРОВ ИНДОЛИЛМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И 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 28.03.2013)

**Введение.** Брассиностероиды (БС) – природные регуляторы роста растений, которые по химической природе являются производными оксистероидов с лактонной группой в кольце В [1]. 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 промоторной области генов-мишеней и после связывания с ними запускают экспрессию этих генов.

В действии БС на рост и развитие растений отмечены также эффекты синергизма с другими фитогормонами, в частности с ауксинами [4]. Ранее был установлен 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, 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 [5].

Эффект ауксина и БС в регуляции клеточного роста может проявляться в перестройке цитоскелета. В клетках гипокоты 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  $\beta$ -тубулиновая генная экспрессия уменьшена и кортикальные микротрубочки расположены беспорядочно. Эти эффекты снимаются экзогенной обработкой БС. В гипокоты арабидопсиса дикого типа обработка ауксином, так же как и обработка БС, может запускать перестройку кортикальных микротрубочек. Как индолилуксусная кислота (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].

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. 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 не 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].

Экспериментально доказано, что при повышении концентрации эпибрасинолида (ЭБ) усиливается фотосинтез и повышается содержание хлорофиллов *a* и *b* [6, 7]. 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 синтез этилена на этапе между S-аденозилметионином и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислотой [8, 9]. Как известно, этилен стимулирует синтез АБК, которая ускоряет старение клеток, тормозит биохимические процессы, являясь антагонистом ауксинов, цитокининов и гиббереллинов.

Существуют данные по воздействию БС на уровень эндогенной АБК [10], ИУК [11], ИУК и индолилмасляной кислоты (ИМК) [12], ГА<sub>3</sub> и АБК [13]. При изучении совместного действия БС и ГА<sub>3</sub> доказана независимая роль обоих фитогормонов в растении [14]. При использовании брасинолида в комбинации с этиленом на колеоптилях риса наблюдался аддитивный ростостимулирующий эффект [15]. Некоторыми авторами было показано, что БС изменяют состав цитокининов в листьях растений [10].

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 [16].

Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* рассматривается как один из основных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала в промышленных объемах. Поэтому представляет интерес изучение эффектов БС, а также их комбинаций с ИМК на разных этапах микроразмножения голубики высокой *Vaccinium corymbosum in vitro*, в частности на этапе укоренения.

Цель работы – сравнительный анализ изменчивости восьми количественных признаков у регенерантов двух сортов голубики высокой *in vitro* на питательных, агаризованных средах укоренения, с органическими соединениями, на макро-, микросолевой основе ½ WPM, содержащих фитогормональные стероиды 24-ЭБ и эпикастастерон (ЭК) в разных комбинациях с ИМК.

**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) 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 трех метамеров) в колбах конических (объемом по 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной питательной среды на половинной микро-, макросолевого основе с органическими соединениями (кроме фитогормонов) по WPM [17, 18], содержащей фитогормоны, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

- Контроль – без фитогормонов;
- 0,2 мг/л ИМК, совместно с 0,2 мг/л ЭК;
- 0,5 мг/л ИМК, совместно с 0,5 мг/л ЭК;
- 1,0 мг/л ИМК, совместно с 1,0 мг/л ЭК
- 0,2 мг/л ИМК, совместно с 0,2 мг/л 24 ЭБ;
- 0,5 мг/л ИМК, совместно с 0,5 мг/л ЭБ;
- 1,0 мг/л ИМК, совместно с 1,0 мг/л ЭБ;
- 0,2 мг/л ИМК;
- 0,5 мг/л ИМК;
- 1,0 мг/л ИМК.

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 люминесцентные лампы OSRAM L36W/76 Natura), относительной влажности воздуха 70 %.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [19] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [20]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа AB-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [21].

**Результаты и их обсуждение.** Результаты изменчивости анализируемых признаков у регенерантов сортов Northland и Patriot *in vitro* приведены в табл. 1 и 2 соответственно.

Анализ высоты регенерантов указывает на то, что в большинстве случаев показатели по отдельным вариантам опыта превышали контрольные значения. При этом достоверное превышение в 1,2–1,4 раза по отношению к контролю чаще наблюдалось при совместном применении ЭБ и ИМК в концентрациях по 0,2–0,5 мг/л (варианты 5–6, табл. 1, 2). Достоверное превышение в 1,4 и в 1,3 раза по отношению к контролю установлено также у сорта Northland в присутствии ЭК и ИМК в концентрациях по 0,2 мг/л и в присутствии только 0,5 мг/л ИМК соответственно (варианты 2 и 9, табл. 1). Наблюдалась также определенная закономерная изменчивость высоты регенерантов с ростом концентраций применяемых фитогормонов. Так, при совместном использовании ЭБ и ИМК с ростом их концентраций в пределах 0,2–1,0 мг/л наблюдалось снижение высоты регенерантов обоих сортов (варианты 5–7, табл. 1, 2). При совместном использовании ЭК и ИМК рост концентраций фитогормонов от 0,2–0,5 мг/л первоначально приводил к снижению высоты регенерантов, а при дальнейшем повышении концентраций от 0,5–1,0 мг/л высота регенерантов увеличивалась (варианты 2–4, табл. 1, 2). При использовании только ИМК у сорта Northland с ростом концентраций от 0,2–0,5 мг/л первоначально наблюдалось увеличение высоты регенерантов, а при дальнейшем повышении концентраций ИМК от 0,5–1,0 мг/л – существенное падение величины показателей признака (варианты 8–10, табл. 1). У сорта Patriot с ростом концентрации ИМК от 0,2–1,0 мг/л наблюдалось уменьшение высоты регенерантов (варианты 8–10, табл. 2).

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, %
1/2 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
1/2 WPM + ЭЖ <sub>0,2</sub> + ИМК <sub>0,2</sub>	<b>2,44 ± 0,13**</b>	0,42 ± 0,02	1,08 ± 0,04	<b>5,43 ± 0,09**</b>	<b>0,0252 ± 0,0009*</b>	<b>54,53 ± 2,92**</b>	0,59 ± 0,01	92,03 ± 5,01
1/2 WPM + ЭЖ <sub>0,5</sub> + ИМК <sub>0,5</sub>	1,77 ± 0,11	0,34 ± 0,01	<b>1,10 ± 0,04*</b>	4,66 ± 0,15	0,0242 ± 0,0007	<b>51,57 ± 1,73**</b>	<b>0,44 ± 0,12*</b>	<b>84,47 ± 6,19*</b>
1/2 WPM + ЭЖ <sub>1,0</sub> + ИМК <sub>1,0</sub>	1,94 ± 0,03	0,44 ± 0,03	1,09 ± 0,03	4,41 ± 0,15	<b>0,0245 ± 0,0009*</b>	<b>59,23 ± 6,47**</b>	0,85 ± 0,18	87,77 ± 2,23
1/2 WPM + ЭБ <sub>0,2</sub> + ИМК <sub>0,2</sub>	<b>2,42 ± 0,23**</b>	<b>0,50 ± 0,01*</b>	<b>1,10 ± 0,03*</b>	<b>4,94 ± 0,31*</b>	0,0233 ± 0,0014	<b>54,63 ± 7,37**</b>	0,50 ± 0,05	88,90 ± 2,20
1/2 WPM + ЭБ <sub>0,5</sub> + ИМК <sub>0,5</sub>	<b>2,17 ± 0,09**</b>	<b>0,52 ± 0,04**</b>	<b>1,14 ± 0,04**</b>	4,83 ± 0,16	<b>0,0253 ± 0,0007*</b>	<b>23,63 ± 6,05**</b>	0,64 ± 0,20	87,80 ± 4,85
1/2 WPM + ЭБ <sub>1,0</sub> + ИМК <sub>1,0</sub>	2,03 ± 0,22	0,45 ± 0,06	1,06 ± 0,04	4,79 ± 0,11	<b>0,0278 ± 0,0016**</b>	<b>57,60 ± 11,09**</b>	0,83 ± 0,15	<b>76,67 ± 1,93**</b>
1/2 WPM + ИМК <sub>0,2</sub>	1,97 ± 0,15	<b>0,52 ± 0,04**</b>	1,01 ± 0,01	4,60 ± 0,27	<b>0,0248 ± 0,0022*</b>	<b>78,83 ± 2,91**</b>	<b>1,45 ± 0,25**</b>	<b>83,37 ± 3,33*</b>
1/2 WPM + ИМК <sub>0,5</sub>	<b>2,22 ± 0,04**</b>	<b>0,51 ± 0,01*</b>	1,06 ± 0,01	4,80 ± 0,14	<b>0,0279 ± 0,0017**</b>	<b>56,20 ± 3,35**</b>	<b>1,41 ± 0,19**</b>	91,10 ± 2,20
1/2 WPM + ИМК <sub>1,0</sub>	1,56 ± 0,04	0,41 ± 0,02	1,03 ± 0,02	4,03 ± 0,23	0,0187 ± 0,0015	<b>56,10 ± 8,59**</b>	<b>1,42 ± 0,13**</b>	<b>82,23 ± 7,79**</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

П р и м е ч а н и е. 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 экплантов. Варианты опыта (индекс обозначает концентрацию в мг/л): WPM – микро-, макросолевая основа питательной среды для древесных растений; ЭЖ – эликтастерон, ЭБ – 24-эпибрасиноид, ИМК – индолмасляная кислота. НСР<sub>0,05</sub> – наименьшая существенная разница при  $P < 0,05$ ; НСР<sub>0,01</sub> – наименьшая существенная разница при  $P < 0,01$ . Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от значения в контроле. То же для табл. 2–3.

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

\*\* Достоверно отличается от контроля 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, %
1/2 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
1/2 WPM + ЭЖ <sub>0,2</sub> + ИМК <sub>0,2</sub>	2,11 ± 0,08	<b>0,36 ± 0,01**</b>	1,18 ± 0,04	<b>5,01 ± 0,24**</b>	0,0284 ± 0,0004	51,13 ± 2,76	<b>0,77 ± 0,12**</b>	70,00 ± 5,09
1/2 WPM + ЭЖ <sub>0,5</sub> + ИМК <sub>0,5</sub>	<b>1,92 ± 0,15*</b>	<b>0,38 ± 0,02**</b>	<b>1,06 ± 0,03**</b>	<b>4,44 ± 0,03**</b>	<b>0,0246 ± 0,0009**</b>	<b>13,37 ± 4,06**</b>	<b>0,21 ± 0,06**</b>	<b>75,57 ± 5,57*</b>
1/2 WPM + ЭЖ <sub>1,0</sub> + ИМК <sub>1,0</sub>	2,29 ± 0,22	<b>0,40 ± 0,02**</b>	<b>1,02 ± 0,02**</b>	5,41 ± 0,44	<b>0,0237 ± 0,0015**</b>	<b>16,90 ± 4,88**</b>	<b>0,54 ± 0,13**</b>	72,23 ± 2,94
1/2 WPM + ЭБ <sub>0,2</sub> + ИМК <sub>0,2</sub>	<b>2,72 ± 0,03*</b>	0,49 ± 0,01	1,18 ± 0,04	5,52 ± 0,13	0,0283 ± 0,0018	<b>17,03 ± 1,13**</b>	<b>0,39 ± 0,08**</b>	<b>91,10 ± 1,10**</b>
1/2 WPM + ЭБ <sub>0,5</sub> + ИМК <sub>0,5</sub>	2,44 ± 0,24	<b>0,46 ± 0,03*</b>	<b>1,15 ± 0,07**</b>	<b>5,16 ± 0,29**</b>	<b>0,0256 ± 0,0013*</b>	<b>11,83 ± 2,13**</b>	<b>0,18 ± 0,01**</b>	<b>87,53 ± 5,42**</b>
1/2 WPM + ЭБ <sub>1,0</sub> + ИМК <sub>1,0</sub>	2,37 ± 0,17	0,55 ± 0,01	<b>1,08 ± 0,08**</b>	<b>5,13 ± 0,25**</b>	<b>0,0228 ± 0,0014**</b>	<b>7,70 ± 2,05**</b>	<b>0,66 ± 0,31**</b>	<b>82,20 ± 9,49**</b>
1/2 WPM + ИМК <sub>0,2</sub>	2,46 ± 0,13	0,54 ± 0,03	<b>1,03 ± 0,03**</b>	5,82 ± 0,23	<b>0,0254 ± 0,0013**</b>	<b>76,73 ± 8,43**</b>	1,43 ± 0,13	68,90 ± 9,49
1/2 WPM + ИМК <sub>0,5</sub>	2,13 ± 0,10	0,54 ± 0,01	<b>1,06 ± 0,01**</b>	5,47 ± 0,06	<b>0,0255 ± 0,0004**</b>	<b>13,87 ± 1,89**</b>	<b>0,97 ± 0,05**</b>	74,47 ± 9,09
1/2 WPM + ИМК <sub>1,0</sub>	2,02 ± 0,20	0,54 ± 0,02	<b>1,00 ± 0,00**</b>	<b>5,09 ± 0,22**</b>	<b>0,0240 ± 0,0015**</b>	<b>34,57 ± 11,00**</b>	<b>0,86 ± 0,13**</b>	<b>36,67 ± 11,46**</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 длины третьего междоузлия у регенерантов исследуемых сортов указывает на существование генотипических различий в характере изменчивости признака. У сорта Northland показатели признака по вариантам опыта чаще были на уровне показателей в контроле (табл. 1). Достоверное превышение по данному признаку в 1,2–1,3 раза наблюдалось при сочетании ЭБ и ИМК в концентрациях по 0,2–0,5 мг/л либо при использовании только ИМК в тех же концентрациях (варианты 5–6, 8–9, табл. 1). У сорта Patriot в присутствии фитогормональных стероидов практически во всех случаях происходило снижение показателей признака по сравнению с контролем. При этом совместное использование ЭК и ИМК приводило к достоверному при  $P < 0,01$  снижению показателей признака в 1,4–1,5 раза по сравнению с контролем (варианты 2–4, табл. 2), с тенденцией увеличения показателей признака с ростом концентраций фитогормонов от 0,2–1,0 мг/л. При использовании только ИМК в составе среды с ростом концентрации ауксина от 0,2–1,0 мг/л у сорта Northland наблюдалось существенное падение величины признака (табл. 1), в то время как у сорта Patriot величина признака не изменялась (табл. 2).

Похожие генотипические различия проявлялись и при анализе изменчивости количества побегов (табл. 1, 2). У сорта Northland показатели признака по вариантам опыта чаще были на уровне показателей в контроле (табл. 1), в то время как у сорта Patriot показатели признака по всем вариантам опыта (в большинстве случаев достоверно при  $P < 0,01$ ) уступали в 1,2–1,3 раза показателям в контроле (табл. 2). У сорта Northland достоверное превышение в 1,1–1,2 раза над контролем наблюдалось в одновременном присутствии ЭБ и ИМК по 0,2–0,5 мг/л, а также в присутствии по 0,5 мг/л ЭК и ИМК (варианты 3, 5–6, табл. 1).

По количеству листьев достоверное превышение в 1,1–1,2 раза над контролем наблюдалось только у сорта Northland при сочетании ЭБ (либо ЭК) и ИМК в концентрациях по 0,2 мг/л (табл. 1). У сорта Patriot показатели количества листьев у регенерантов по всем вариантам опыта (в большинстве случаев достоверно при  $P < 0,01$ ) уступали в 1,1–1,3 раза показателям в контроле (табл. 2).

Практически во всех случаях (за исключением варианта 10 с 1,0 мг/л ИМК) у сорта Northland наблюдалось увеличение показателей сырого веса регенерантов по сравнению с контролем (табл. 1). Достоверное превышение в 1,2–1,4 раза по отношению к контролю установлено в вариантах опыта с ЭБ и ИМК по 0,5–1,0 мг/л (варианты 6–7, табл. 1), с ИМК в концентрации 0,2–0,5 мг/л (варианты 8–9, табл. 1), с ЭК и ИМК в концентрациях по 0,2 и 1,0 мг/л (варианты 2 и 4, табл. 1). По аналогии с высотой регенерантов наблюдалась похожая закономерность изменчивости показателей сырого веса регенерантов с ростом концентраций фитогормонов. При совместном использовании ЭК и ИМК рост концентраций фитогормонов от 0,2–0,5 мг/л первоначально приводил к снижению величины признака, а при дальнейшем повышении концентраций от 0,5–1,0 мг/л показатели сырого веса регенерантов увеличивались (варианты 2–4, табл. 1). При использовании только ИМК с ростом концентраций от 0,2–0,5 мг/л первоначально наблюдалось увеличение показателей, а при дальнейшем повышении концентраций ИМК от 0,5–1,0 мг/л – существенное падение величины признака (варианты 8–10, табл. 1). При совместном использовании ЭБ и ИМК, в отличие от изменчивости высоты регенерантов, с ростом концентраций фитогормонов в пределах 0,2–1,0 мг/л наблюдалось существенное увеличение показателей сырого веса регенерантов (варианты 5–7, табл. 1).

У сорта Patriot применение исследуемых фитогормонов в составе питательной среды приводило по сравнению с контролем к снижению в 1,2–1,3 раза показателей сырого веса регенерантов, достоверному в подавляющем большинстве случаев (табл. 2). При сочетании ЭБ (либо ЭК) и ИМК наблюдалось существенное снижение показателей признака с увеличением концентраций фитогормонов от 0,2–1,0 мг/л (варианты 2–7, табл. 2). Увеличение концентрации ИМК от 0,2–1,0 мг/л при самостоятельном использовании фитогормона приводило к незначительному снижению показателей сырого веса регенерантов (варианты 8–10, табл. 2).

Анализ укореняемости регенерантов исследуемых сортов указывает на существенное, в подавляющем большинстве случаев достоверное при  $P < 0,01$  снижение в 1,2–7,5 раза показателей признака на средах с фитогормонами по сравнению с контролем (табл. 1, 2). Наиболее высокие показатели укореняемости регенерантов среди вариантов опыта наблюдались в присутствии только 0,2 мг/л ИМК (вариант 8, табл. 1–2). При этом у сорта Patriot по укореняемости регенерантов наблюдалось единственное превышение в 1,3 раза по сравнению с контролем (табл. 2). Минимальная укорен-

няемость регенерантов обоих сортов наблюдалась на среде с ЭБ и ИМК по 0,5 мг/л для сорта Northland (в 3,9 раза ниже показателей в контроле, табл. 1), и по 0,5–1,0 мг/л для сорта Patriot (в 4,9–7,5 раза ниже показателей в контроле, табл. 2). С ростом концентрации ИМК в пределах 0,2–1,0 мг/л при отсутствии фитогормональных стероидов в составе среды наблюдалась тенденция уменьшения показателей анализируемого признака (варианты 8–10, табл. 1, 2).

Анализ изменчивости длины корней указывает на выраженные генотипические различия между исследуемыми сортами. Так, у сорта Northland в присутствии только ИМК наблюдалось достоверное при  $P < 0,01$  увеличение длины корней в 1,7–1,8 раза по сравнению с контролем (табл. 1). В остальных случаях наблюдалось чаще незначительное (за единственным исключением) в присутствии фитогормональных стероидов укорачивание корней у регенерантов по сравнению с контролем (табл. 1). В присутствии ЭК и ИМК по 0,5 мг/л установлено достоверное при  $P < 0,05$  укорачивание корней в 1,8 раза по сравнению с контролем (вариант 3, табл. 1). У сорта Patriot в присутствии фитогормонов отмечено достоверное при  $P < 0,01$  (за единственным исключением) укорачивание корней у регенерантов в 1,6–8,7 раза по сравнению с контролем (табл. 2). При этом в присутствии только ИМК отмечено снижение величины анализируемого признака с ростом концентрации фитогормона в пределах 0,2–1,0 мг/л (варианты 8–10, табл. 2).

По жизнеспособности эксплантов у сорта Northland достоверное снижение показателей по сравнению с контролем в 1,1–1,3 раза наблюдалось в присутствии ЭК и ИМК по 0,5 мг/л, ЭБ и ИМК по 1,0 мг/л, а также ИМК в концентрациях 0,2 и 1,0 мг/л (варианты 3, 7, 8, 10, табл. 1). У сорта Patriot наблюдалось (за единственным исключением) повышение в 1,2–1,4 раза жизнеспособности эксплантов в присутствии фитогормонов по сравнению с контролем, достоверное в присутствии ЭК и ИМК по 0,5 мг/л, ЭБ и ИМК по 0,2–1,0 мг/л (табл. 2). В присутствии ЭБ и ИМК у сорта Patriot установлена закономерность уменьшения жизнеспособности эксплантов с ростом концентраций фитогормонов в пределах 0,2–1,0 мг/л (варианты 5–7, табл. 2). В присутствии 1,0 мг/л ИМК жизнеспособность эксплантов снижалась в 1,8 раза по сравнению с контролем (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 пяти случаях при  $P < 0,01$ ) влияние генотипа на изменчивость семи из восьми исследуемых признаков с долей влияния 3–30 % (табл. 3). При этом установлена наиболее высокая доля влияния генотипа на измен-

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	59	0,123	100,0	0,006	100,0	0,007	100,0	0,327	100,0
Фактор А	1	<b>0,955**</b>	13,2	<b>0,010*</b>	3,0	<b>0,016*</b>	3,9	<b>5,346**</b>	27,7
Фактор В	9	<b>0,318**</b>	39,5	<b>0,020**</b>	54,2	<b>0,015**</b>	31,8	<b>0,401**</b>	18,7
А × В	9	0,119	14,7	<b>0,008**</b>	21,1	<b>0,013**</b>	27,3	<b>0,554**</b>	25,8
Повторности	2	0,009	0,2	0,000	0,1	0,005	2,6	0,608	6,3
Случайные отклонения	38	0,062	32,4	0,002	21,6	0,004	34,4	0,109	21,5
ИВ	df	СВР		УР		ДК		ЖЭ	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	59	0,001	100,0	700,058	100,0	0,248	100,0	247,818	100,0
Фактор А	1	<b>0,001**</b>	6,9	<b>12143,880**</b>	29,4	0,287	1,9	<b>3281,162**</b>	22,5
Фактор В	9	<b>0,001**</b>	21,2	<b>2221,268**</b>	48,4	<b>0,902**</b>	55,4	<b>402,814**</b>	24,8
А × В	9	<b>0,001**</b>	41,2	<b>453,108**</b>	9,9	0,221	13,6	<b>375,885**</b>	23,1
Повторности	2	0,000	0,5	208,706	1,0	0,072	1,0	37,752	0,5
Случайные отклонения	38	0,000	30,2	122,967	11,3	0,108	28,1	112,008	29,1

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

чивость жизнеспособности эксплантов (22,5 %) , количества листьев (27,7 %) и укореняемости регенерантов (29,4 %). Установлено высокодостоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние фитогормонального состава среды на изменчивость всех анализируемых признаков с долей влияния 19–56 % (табл. 3). При этом установлена наиболее высокая доля влияния фактора на изменчивость длины корней (55,4 %) и длины третьего междоузлия (54,2 %).

Совокупность исследуемых факторов оказывает достоверное при  $P < 0,01$  влияние на изменчивость шести из восьми исследуемых признаков с долей влияния 10–42 % (табл. 3). При этом установлена наиболее высокая доля влияния совокупности генотипа и фитогормонального состава среды на изменчивость сырого веса регенерантов (41,2 %).

**Заключение.** Установлены различия по изменчивости анализируемых признаков в зависимости от фитогормонального состава среды. Наблюдалась определенная закономерность изменчивости высоты и сырого веса регенерантов с ростом концентраций применяемых фитогормонов. При совместном использовании ЭБ и ИМК с ростом их концентраций в пределах 0,2–1,0 мг/л наблюдалось снижение высоты регенерантов обоих сортов.

При совместном использовании ЭК и ИМК рост концентраций фитогормонов от 0,2–0,5 мг/л первоначально приводил к снижению высоты регенерантов, а при дальнейшем повышении концентраций от 0,5–1,0 мг/л высота регенерантов увеличивалась. При использовании только ИМК у сорта Northland с ростом концентраций от 0,2–0,5 мг/л первоначально наблюдалось увеличение высоты регенерантов, а при дальнейшем повышении концентраций ИМК от 0,5–1,0 мг/л – существенное падение величины показателей признака. При совместном использовании ЭК и ИМК рост концентраций фитогормонов от 0,2–0,5 мг/л первоначально приводил к снижению величины признака, а при дальнейшем повышении концентраций от 0,5–1,0 мг/л показатели сырого веса регенерантов увеличивались. При использовании только ИМК с ростом концентраций от 0,2–0,5 мг/л первоначально наблюдалось увеличение показателей, а при дальнейшем повышении концентраций ИМК от 0,5–1,0 мг/л – существенное падение величины признака. При совместном использовании ЭБ и ИМК, в отличие от изменчивости высоты регенерантов, с ростом концентраций фитогормонов в пределах 0,2–1,0 мг/л наблюдалось существенное увеличение показателей сырого веса регенерантов. Использование фитогормонов по сравнению с контролем чаще приводило к достоверному увеличению показателей высоты регенерантов в 1,2–1,4 раза, длины третьего междоузлия в 1,2–1,3 раза (только у сорта Northland), сырого веса регенерантов в 1,2–1,4 раза (только у сорта Northland), жизнеспособности эксплантов в 1,2–1,4 раза (только у сорта Patriot).

Установлено достоверное (в большинстве случаев при  $P < 0,01$ ) влияние генотипа, фитогормонального состава среды и совокупности двух факторов на изменчивость подавляющего большинства анализируемых признаков, соответственно – семи из восьми признаков с долей влияния 3–30 %, всех признаков с долей влияния 19–56 %, шести из восьми признаков с долей влияния 10–42 %.

## Литература

1. Hayat S., Ahmad A. *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Berlin: Springer-Verlag, 2010.
2. Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M. et al. // *Nature*. 2011. Vol.474. P. 467–471.
3. She J., Han Zh., Kim T. et al. // *Nature*. 2011. Vol. 474. P. 472–476.
4. Hardtke Ch.S., Dorcey E., Osmont K. S., Sibout R. // *Trends Cell Biol*. 2007. Vol. 17. P. 485–492.
5. Vert G., Walcher C. L., Chory J., Nemhauser J. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105. P. 9829–9834.
6. Kalituhu L. N., Chaika M. T., Mazhul V. M., Khrupach V. A // *Proc. Twenty-Third Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America*. Calgary, 1996. P. 36–40.
7. Свами К.Н., Пао С.С.Р. // *Физиол. растен*. 2009. Т. 56. С. 682–687.
8. Arteca R. N. // *Plant Growth Substances. Principles and Applications* / Ed. R. N. Arteca New York: Chapman and Hall, 1995. P. 127–145.
9. Joo S., Seo Y. S., Kim S. M. et al. // *Physiol. Plant*. 2006. Vol. 126. P. 592–604.
10. Kozick T. A., Kislin E. N. Effect of brassinosteroids on cytokinin and ABA level in barley plants // *Workshop on Brassinosteroids*. 1991. P. 29–30.
11. Kurapov P. B. *Hormonal balance in plants*. Doctor of Sciences Degree Thesis. Tummyryazev Agricultural Academy, Moscow, 1996.

12. Luo B., Yu D., Zhou D. // *Plant Physiol. Commun.* 1988. P. 31–34.
13. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Groot A. E. *Brassinosteroids. A new class of plant hormones.* San Diego: Academic Press, 1999.
14. Gregory L. E., Mandava N. B. // *Physiol. Plant.* 1982. Vol. 54. P. 239–243.
15. Zhou A.-Q. // *Plant Physiol. Commun.* 1987. P. 19–22.
16. Кудряшова О. А., Волотович А. А., Хрипач В. А. и др. // *Физиол. растен.* 2012. Т. 59, № 4. С. 632–640.
17. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. *Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений.* Мн., 1996.
18. Trigiano R. N., Gray D. J. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises.* US/MA, CRC Press LLC. 1999–2000.
19. Доспехов Б. А. *Методика полевого опыта.* М., 1985.
20. Боровиков В. П. *STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере.* СПб., 2001.
21. Анощенко Б. Ю. // *Генетика.* 1994. Т. 30. С. 8–9.

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

**VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS IN REGENERANTS OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* IN VITRO UNDER INFLUENCE OF INDOLEBUTYRIC ACID AND 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 auxins in 9 variants of experience are given presented. Distinctions on variability of analyzed traits depending on phytohormonal structure of the medium are established. A certain regularity of variability of height and crude weight of regenerants with growth of concentration of applied phytohormones was observed. Usage of phytohormones in comparison with control more often led to reliable increase in indicators of regenerant height by 1.2–1.4 times, lengths of the third interstice by 1.2–1.3 times (only at Northland cultivar), the crude weight of regenerants by 1.2–1.4 times (only at Northland cultivar), viability of explants by 1.2–1.4 times (only at Patriot cultivar). It is established reliable (in most cases at  $P < 0.01$ ) influence of a genotype, phytohormonal structure of the medium and set of two factors on variability of the vast majority of analyzed traits, respectively – seven of eight traits from shares of influence of 3–30 %, all traits from shares of influence of 19–56 %, six of eight traits from shares of influence of 10–42 %.