

УДК 57.085:634.73:547-314

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ СОРТА «РЕКА» ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. ПРИ УКОРЕНЕНИИ *IN VITRO*

**В.А. МЕНДЕЛЕВА, Д.А. ВОРДОМАЦКАЯ,  
О.А. КУДРЯШОВА, А.А. ВОЛОТОВИЧ**

*Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь, volant777@tut.by*

**Введение.** Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный вид для культивирования в условиях Беларуси [1].

Для обеспечения внутреннего рынка Беларуси посадочным материалом сортовой голубики, а также для выхода на экспорт требуется постоянное совершенствование технологии для ускорения производства качественного посадочного материала с минимизацией затрат при максимальном выходе продукта. Наиболее быстрый способ размножения голубики – микроразмножение *in vitro* [2].

Укоренение на питательных средах микроклонально размноженных побегов голубики высокой является важным этапом в получении хорошо адаптированного растительного материала. Предварительно укорененные *in vitro* экспланты хорошо переносят процесс начальной адаптации [2].

Процесс ризогенеза (корнеобразования) имеет три фазы: индукция, инициация и элонгация. Общеизвестно, что ауксины выступают в качестве индуктора ризогенеза у растений [2–4]. Этап укоренения голубики высокой *in vitro* требует доработки с учетом особенностей каждого конкретного сорта, его отзывчивости к действию определенного ауксина в определенной концентрации.

Ауксины используют в концентрациях от 0,01 до 10 мг/л [2–4]. Ауксины вызывают дедифференцировку клеток, растяжение клеточной оболочки, деление клеток, образование каллуса и корней, а также ингибируют образование боковых побегов. При низких концентрациях ауксины иницируют ризогенез, а при высоких преобладает образование каллуса [2].

В настоящей статье приведены результаты анализа изменчивости семи количественных признаков у регенерантов голубики высокой сорта «Река» *in vitro* на питательных, агаризованных средах для укоренения, с органическими соединениями, на макро-, микросолеевой основе  $\frac{1}{2}$  WPM (Woody Plant Medium – среда для культивирования древесных растений), различающихся по составу ауксинов.

**Методика и объекты исследования.** Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» в июне-сентябре 2012 г.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сорта «Река» голубики высокой *V. corymbosum* L. Общее количество анализируемых регенерантов каждого сорта, для каждого варианта опыта составило не менее 120 шт. (четыре стеклянные емкости, 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 половинной ( $\frac{1}{2}$ ) микро-, макро- солевой основе, с органическими соединениями (кроме фитогормонов) по WPM [2, 5], содержащей фитогормоны, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

11. Контроль – без фитогормонов;
12. ИУК 2,0 мг/л;
13. ИУК 1,5 мг/л;
14. ИУК 1,0 мг/л;
15. ИУК 0,5 мг/л;
16. ИУК 0,1 мг/л;
17. ИМК 2,0 мг/л;
18. ИМК 1,5 мг/л;
19. ИМК 1,0 мг/л;
20. ИМК 0,5 мг/л;
21. ИМК 0,1 мг/л.

Учет анализируемых показателей – сырой вес регенеранта, высота регенерантов, количество листьев, длина корней, укореняемость регенерантов, жизнеспособность регенерантов, коэффициент эффективности укоренения регенерантов (как произведение показателей укореняемости регенерантов и жизнеспособности регенерантов) – проводили через 10 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, 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 [6] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [7]. 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 [8].

**Результаты и их обсуждение.** В таблице 1 приведены результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у регенерантов сорта «Река» *in vitro*. Выделены значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) отличающиеся от показателей анализируемых признаков в контроле. Общий анализ изменчивости показателей исследуемых признаков указывает на то, что в подавляющем большинстве случаев наблюдалось превышение (часто достоверное по высоте регенерантов, длине корней, жизнеспособности и укореняемости регенерантов, коэффициенту эффективности укоренения регенерантов) значений по отдельным вариантам опыта над контрольными значениями.

Несмотря на то, что по сырому весу регенерантов достоверных отличий по отношению к контролю в вариантах опыта не было установлено, тем не менее, наблюдались определенные тенденции изменчивости признака. Так с повышением концентрации ИУК от 0,1 мг/л до 2,0 мг/л в составе питательной среды, в целом, наблюдался рост показателей анализируемого признака. При этом при концентрации ИУК 0,1 мг/л показатели анализируемого признака были меньше контрольных в 1,1 раза, а при концентрации ИУК 2 мг/л – выше контрольных в 1,4 раза. В присутствии ИМК наиболее высокие значения сырого веса регенерантов, превышающие значения в контроле в 1,3 и 1,5 раз, соответственно, наблюдались при концентрациях 1,5 и 0,5 мг/л (табл. 1).

По высоте регенерантов наиболее высокие значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) превышающие показатели признака в контроле, наблюдались в вариантах опыта с 0,1 и 1 мг/л ИУК, а также с 0,1 и 0,5 мг/л ИМК. При этом превышение показателей высоты регенерантов по отношению к контролю составило в 1,3; 1,4; 1,4 и 2 раза, соответственно (табл. 1). Во всех остальных случаях наблюдалось превышение (за исключением вариантов с 1 и 1,5 мг/л ИМК) по отношению к контролю в 1,1–1,2 раза. В присутствии ИМК наблюдалась характерная тенденция первоначального уменьшения показателей исследуемого признака при росте концентраций от 0,1 до 1,0 мг/л, с последующим возрастанием высоты регенерантов при росте концентраций от 1,0 до 2,0 мг/л ИМК (табл. 1).

Наиболее высокие показатели количества листьев, достоверно (при  $P < 0,05$ ) превышающие показатели в контроле в 1,2 раза, наблюдались в присутствии 0,1 мг/л ИМК, а наиболее низкие (в 1,4 раза ниже контрольных при  $P < 0,05$ ) – в присутствии 1,0 мг/л ИМК. Во всех остальных случаях достоверных отличий от контрольных показателей не установлено. Тем не менее, у половины исследуемых вариантов показатели были ниже контрольных в 1,1–1,3 раза (табл. 1). Следует также отметить тенденцию первоначального убывания показателей исследуемого признака с увеличением концентраций ауксинов от 0,1 до 1,0 мг/л ИМК и от 0,1 до 1,5 мг/л ИУК, с последующим возрастанием показателей количества листьев при дальнейшем увеличении концентраций ауксинов от 1,0 до 2,0 мг/л ИМК и от 1,5 до 2,0 мг/л ИУК (табл. 1).

В присутствии ауксинов во всех исследуемых случаях длина корней у регенерантов достоверно (чаще при  $P < 0,01$ ) превышала показатели признака в контроле в 1,8–3,0 раза (табл. 1). Наиболее высокие показатели анализируемого признака наблюдались в присутствии 0,5–2,0 мг/л ИМК (превышение по отношению к контролю в 2,5–3,0 раза). С ростом концентрации ИУК от 0,1 до 1,0 мг/л первоначально наблюдалось увеличение показателей длины корней, а при дальнейшем увеличении концентрации ИУК от 1,0 до 2,0 мг/л – показатели исследуемого признака снижались (табл. 1). Следует также отметить, что в присутствии 0,5–2,0 мг/л ИМК длина корней существенно в 1,3–1,7 раза превышала соответствующие показатели у регенерантов в присутствии 0,1–2,0 мг/л ИУК (табл. 1).

Наиболее высокие показатели жизнеспособности регенерантов, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) превышающие показатели в контроле в 1,4 и 1,5 раз, наблюдались в при-

сутствии 0,5 мг/л ИУК и 0,1 мг/л ИМК, соответственно (табл. 1). Следует отметить тенденцию существенного снижения показателей анализируемого признака с ростом концентраций ауксинов в составе питательной среды. При этом в присутствии 0,5 – 2,0 мг/л ИМК наблюдалось снижение показателей признака по отношению к контролю в 1,5–2,2 раза (табл. 1).

По укореняемости регенерантов в подавляющем большинстве случаев (за исключением вариантов с 1,0 и 2,0 мг/л ИМК) в присутствии ауксинов наблюдалось превышение показателей анализируемого признака по сравнению с контрольными показателями в 1,1–1,3 раза (табл. 1). Наиболее высокие показатели исследуемого признака (достоверно при  $P < 0,05$  превышающие контрольные показатели в 1,2–1,3 раза) наблюдались в присутствии 0,1–1,5 мг/л ИУК (табл. 1). С ростом концентрации ИМК от 0,1 до 1,0 мг/л первоначально наблюдалось уменьшение показателей исследуемого признака, при дальнейшем увеличении концентрации ИМК от 1,0 до 2,0 мг/л – показатели признака начинали увеличиваться (табл. 1).

Для более точной оценки и сравнительного анализа эффектов разных концентраций ауксинов на получение жизнеспособных, укорененных регенерантов, нами **впервые** был введен дополнительный параметр – коэффициент эффективности укоренения регенерантов, определяемый как произведение показателей жизнеспособности и укореняемости регенерантов по каждому варианту опыта в отдельности. При этом брались беспроцентные показатели каждого из признаков. Сравнительный анализ значений коэффициента эффективности укоренения регенерантов установил наиболее оптимальные диапазоны концентраций исследуемых ауксинов. Так для ИУК это диапазон 0,1–1,0 мг/л, а для ИМК – только 0,1 мг/л. В указанном диапазоне концентраций ИУК наблюдалось достоверное превышение показателей анализируемого признака по отношению к контролю в 1,6–1,7 раза. В случае 0,1 мг/л ИМК наблюдалось достоверное превышение по отношению к контролю в 1,8 раза (табл. 1). Указанные концентрации ауксинов можно рекомендовать для применения с целью получения наибольшего количества жизнеспособных, укорененных регенерантов сорта «Река».

Двухфакторный дисперсионный анализ установил достоверность (чаще при  $P < 0,01$ ) влияния исследуемых факторов (тип ауксина и их концентрации) по отдельности, а также совокупного их действия на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов (табл. 2).

Разные концентрации ауксинов, а также совокупность указанного фактора и типа ауксина оказывали достоверное влияние на изменчивость признаков высота регенерантов, жизнеспособность и укореняемость регенерантов. При этом доли влияния факторов в зависимости от анализируемого признака находились в диапазоне от 17–52 % (табл. 2).

Тип ауксина оказывал достоверное влияние на изменчивость признаков длина корней, жизнеспособность и укореняемость регенерантов. При этом доли влияния факторов в зависимости от анализируемого признака находились в диапазоне от 22–41 % (табл. 2).

Разные концентрации исследуемых ауксинов также оказывали достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние на изменчивость количества листьев. При этом доля влияния фактора составила 53 % (табл. 2).

На изменчивость жизнеспособности и укореняемости регенерантов достоверное влияние оказывали все исследуемые факторы и их совокупности, с долями влияния в диапазонах 17–45 % и 19–29 %, соответственно (табл. 2).

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

Вариант опыта	СВР, г	ВР, см	КЛ, шт.	ДК, см	ЖР, %	УК, %	КЭ
Контроль ( $1/2$ WPM-основа)	0,0317±0,0089	1,25±0,11	5,3±0,3	0,79±0,22	66,7±5,8	79,5±10,6	0,53
ИУК <sub>2,0</sub>	0,0458±0,0111	1,51±0,15	5,0±0,7	<b>1,49±0,12**</b>	56,7±10,7	96,6±1,7	0,55
ИУК <sub>1,5</sub>	0,0441±0,0043	1,38±0,17	4,7±0,5	<b>1,41±0,07*</b>	52,2±5,9	<b>100,0±0,0*</b>	0,52
ИУК <sub>1,0</sub>	0,0375±0,0016	<b>1,63±0,06*</b>	5,1±0,1	<b>1,63±0,11**</b>	87,8±5,5	<b>98,8±1,2*</b>	<b>0,87**</b>
ИУК <sub>0,5</sub>	0,0450±0,0140	1,58±0,12	5,4±0,2	<b>1,52±0,11**</b>	<b>91,1±8,9*</b>	<b>98,5±1,5*</b>	<b>0,90**</b>
ИУК <sub>0,1</sub>	0,0279±0,0012	<b>1,73±0,12*</b>	6,0±0,2	<b>1,46±0,08*</b>	85,6±4,4	<b>100,0±0,0*</b>	<b>0,86**</b>
ИМК <sub>2,0</sub>	0,0407±0,0026	1,35±0,13	4,5±0,3	<b>1,97±0,15**</b>	<b>29,7±6,7**</b>	70,2±16,1	<b>0,21**</b>
ИМК <sub>1,5</sub>	0,0431±0,0024	1,26±0,07	4,3±0,2	<b>2,33±0,23**</b>	<b>38,7±7,0*</b>	83,0±4,0	<b>0,32**</b>
ИМК <sub>1,0</sub>	0,0368±0,0042	1,10±0,11	<b>3,9±0,4*</b>	<b>1,95±0,13**</b>	<b>44,0±9,0*</b>	62,5±7,2	<b>0,28**</b>
ИМК <sub>0,5</sub>	0,0469±0,0083	<b>1,74±0,13**</b>	5,4±0,1	<b>2,17±0,12**</b>	<b>43,0±6,8*</b>	96,3±1,9	<b>0,41**</b>
ИМК <sub>0,1</sub>	0,0390±0,0049	<b>2,46±0,16**</b>	<b>6,5±0,6*</b>	<b>1,50±0,23**</b>	<b>96,3±2,0**</b>	<b>98,7±1,3*</b>	<b>0,95**</b>
НСР <sub>0,05</sub>	<b>0,0198</b>	<b>0,36</b>	<b>1,1</b>	<b>0,51</b>	<b>21,5</b>	<b>18,2</b>	<b>0,04</b>
НСР <sub>0,01</sub>	<b>0,0271</b>	<b>0,49</b>	<b>1,5</b>	<b>0,69</b>	<b>29,4</b>	<b>24,8</b>	<b>0,07</b>

Примечание – \* – достоверно отличается от контрольных значений при  $P < 0,05$ ; \*\* – при  $P < 0,01$ ; СВР – сырой вес регенеранта, г; ВР – высота регенерантов, см; КЛ – количество листьев, шт.; ДК – длина корней, см; ЖР – жизнеспособность регенерантов, %; УК – укореняемость регенерантов, %; КЭ – коэффициент эффективности укоренения регенерантов; то же для таблицы 2

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

ИВ	df	СВР		ВР		КЛ		ДК		ЖР		УК	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	29	0,000	-	0,162	100,00	0,873	100,00	0,146	100,00	687,656	100,00	246,439	100,00
Фактор А	1	0,000	-	0,002	0,04	0,750	2,96	<b>1,732**</b>	40,80	<b>4438,400**</b>	22,26	<b>2075,009**</b>	29,03
Фактор В	4	0,000	-	<b>0,612**</b>	52,03	<b>3,337**</b>	52,71	0,150	14,15	<b>2259,901**</b>	45,33	<b>410,786*</b>	22,99
АхВ	4	0,000	-	<b>0,329**</b>	27,96	0,592	9,35	0,166	15,66	<b>861,851**</b>	17,28	<b>347,119*</b>	19,43
Повторности	2	0,000	-	0,038	1,62	0,420	3,32	0,001	0,04	38,602	0,39	102,229	2,86
Случайные отклонения	18	0,000	-	0,048	18,35	0,445	31,66	0,069	29,35	163,300	14,74	101,981	25,69

Примечание – Прочерк «-» означает отсутствие данных; ИВ – источник варьирования; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – ауксин (ИУК, ИМК); фактор В – концентрация ауксина (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л)

**Выводы.** Общий анализ изменчивости показателей исследуемых признаков указывает на то, что в подавляющем большинстве случаев наблюдалось превышение (часто достоверное в случае признаков высота регенерантов, длина корней, жизнеспособность и укореняемость регенерантов, коэффициент эффективности укоренения регенерантов) значений по отдельным вариантам опыта над контрольными значениями.

По высоте регенерантов наиболее высокие значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) превышающие показатели признака в контроле, наблюдались в вариантах опыта с 0,1 и 1 мг/л ИУК, а также с 0,1 и 0,5 мг/л ИМК. При этом превышение показателей высоты регенерантов по отношению к контролю составило в 1,3; 1,4; 1,4 и 2 раза, соответственно.

Наиболее высокие показатели количества листьев, достоверно (при  $P < 0,05$ ) превышающие показатели в контроле в 1,2 раза, наблюдались в присутствии 0,1 мг/л ИМК, а наиболее низкие (в 1,4 раза ниже контрольных при  $P < 0,05$ ) – в присутствии 1,0 мг/л ИМК.

В присутствии ауксинов во всех исследуемых случаях длина корней у регенерантов достоверно (чаще при  $P < 0,01$ ) превышала показатели признака в контроле в 1,8–3,0 раза.

Наиболее высокие показатели жизнеспособности регенерантов, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) превышающие показатели в контроле в 1,4 и 1,5 раз, наблюдались в присутствии 0,5 мг/л ИУК и 0,1 мг/л ИМК, соответственно.

Наиболее высокие показатели укореняемости регенерантов (достоверно при  $P < 0,05$  превышающие контрольные показатели в 1,2–1,3 раза) наблюдались в присутствии 0,1–1,5 мг/л ИУК.

Сравнительный анализ значений коэффициента эффективности укоренения регенерантов (**впервые** введенный авторами дополнительный параметр) установил наиболее оптимальные диапазоны концентраций исследуемых ауксинов: для ИУК – диапазон от 0,1–1,0 мг/л, а для ИМК – только концентрация 0,1 мг/л. В указанном диапазоне концентраций ИУК наблюдалось достоверное превышение показателей анализируемого признака по отношению к контролю в 1,6–1,7 раза. В случае 0,1 мг/л ИМК наблюдалось достоверное превышение по отношению к контролю в 1,8 раза. Указанные концентрации ауксинов можно рекомендовать для применения с целью получения наибольшего количества жизнеспособных, укорененных регенерантов сорта «Река».

Двухфакторный дисперсионный анализ установил достоверность (чаще при  $P < 0,01$ ) влияния исследуемых факторов (тип ауксина и их концентрации) по отдельности, а также совокупного их действия на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов. При этом доля достоверного влияния исследуемых факторов и их совокупностей в зависимости от анализируемого признака находилась в диапазоне от 17–53%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рупасова, Ж.А. Фиторекультивация выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений севера Беларуси на основе возделывания ягодных растений семейства Ericaceae / Ж.А. Рупасова, А.П. Яковлев, В.Н. Решетников – Мн., 2011. – 282 с.
2. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас – Минск, 1996. – 246 с.
3. Litwinczuk, W. Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium x coveleanum* But. Et Pl.) «Herbert» *in vitro* shoot cultures / W. Litwinczuk, M. Wadas // Scientia Horticulturae. – 2008. – Vol.119. – P. 41–48.
4. Lambardi, M. Protocol for micropropagation of selected economically-important horticultural plants / M. Lambardi, E. Ozudogru, S. Jain. – Springer Protocols: Humana press, 2013. – 490 p.
5. Trigiano R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
6. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
7. Боровиков, В.П. STATISTICA : Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб : Питер, 2001. – 688 с.
8. Анощенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.

**ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS  
AT «REKA» CULTIVAR OF HIGHBUSH BLUEBERRY VACCINIUM  
CORYMBOSUM L. WHEN ROOTING IN VITRO**

***V.A. MENDELEVA, D.A. VORDOMACKAYA,  
O.A. KUDRYASHOVA, A.A. VOLOTOVICH***

***Summary***

In the present article are given the results of the analysis of variability of seven quantitative traits at regenerants of high-bush blueberry of «Reka» cultivar *in vitro* on nutrient, agarized mediums for rooting, with organic compounds, on macro- and micro- mineral basis of ½ WPM differing on composition of auxins (IAA, IBA) in different concentration. The characteristic introduced by authors for the first time of new parameter – effectiveness ratio of rooting of regenerants – is provided. The comparative analysis of values of the coefficient established the most optimum concentration of studied auxins for their application for the purpose of receiving the greatest number of the viable, implanted regenerants of 'Reka' cultivar: for IAA the range is from 0.1 mg/l till 1.0 mg/l, for IBA is only 0.1 mg/l. In the specified concentration of auxins reliable excess of indicators of the analyzed coefficient in relation to control by 1.6–1.8 times was observed. The two-factorial dispersive analysis established reliability (more often at  $P < 0.01$ ) influences of studied factors (type of auxins and their concentration) as separately, and also of their cumulative action on variability of all analyzed traits, excepted for the moist weight of regenerants.

© Менделева В.А., Вордомацкая Д.А., Кудряшова О.А., Волотович А.А.

*Поступила в редакцию 14 марта 2013г.*