

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ  
У РЕГЕНЕРАНТОВ *RIBES NIGRUM* СОРТА «TISEL» *IN VITRO*  
НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА В ПРИСУТСТВИИ  
6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА**

**Т.П. КУНАХОВЕЦ, О.А. КУДРЯШОВА, А.А. ВОЛОТОВИЧ**

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

**Введение.** Смородина черная (*Ribes nigrum* L.) – основной вид рода *Ribes* семейства Grossulariaceae [1].

Черная смородина относится к культурам, легко размножаемым традиционными методами (например, одревесневшими или зелеными черенками, а также отводками). Тем не менее, для производства свободного от инфекций посадочного материала смородины черной в промышленных объемах в настоящее время предлагается технология клонального микроразмножения *in vitro* растений данного вида [1].

В частности, для асептического введения, инициации побегообразования и стабилизации смородины черной *in vitro* предлагается агаризованная питательная среда на основе Мурасиге–Скуга (MS) [1, 2], содержащая 0,4 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,1 мг/л ИМК; для размножения регенерантов – среда MS с 0,8 мг/л 6-БАП, а для укоренения регенерантов смородины черной – среда MS с 1,0 мг/л ИМК [1].

Таким образом, сведения об изменчивости количественных признаков у смородины черной *in vitro* в настоящее время, в основном, сводятся к универсальному протоколу клонального микроразмножения растений этого вида *in vitro*, в целом, без учета генотипических различий между разными сортами смородины черной, которые (генотипические различия) влияют на специфичность ответа растений определенного сорта на изменившиеся условия культивирования.

В настоящей статье приведены результаты сравнительного анализа изменчивости семи количественных признаков у регенерантов смородины черной сорта «Tisel» *in vitro* на питательных, агаризованных средах, с органическими соединениями, на макро-, микросолевого основе WPM (Woody Plant Medium – среда для культивирования древесных растений), Андерсона и Мурасиге–Скуга (MS), в присутствии 6-бензиламинопурина в разных концентрациях.

**Методика и объекты исследования.** Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» (далее НИЛ КТР ПолесГУ) в ноябре 2013 г. – январе 2014 г.

Асептическое введение и стабилизацию смородины черной сорта «Tisel» *in vitro* на микро-, макросолевого основе, с органическими соединениями по MS [1, 2], в присутствии либо 0,5–1,0 мг/л 6-БАП, либо при сочетании 0,5–1,0 мг/л 6-БАП и 0,10–0,25 мг/л ИМК, осуществляли на базе НИЛ КТР ПолесГУ в марте–июне 2013 года, в соответствии с методом [3], разработанным на базе НИЛ КТР ПолесГУ на сортовой голубике высокорослой, и изложенном в заявке о выдаче патента на изобретение №А20111446 от 31.10.2011 года.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сорта «Tisel» смородины черной. Общее количество анализируемых регенерантов 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 микро-, макро- солевой основе, с органическими соединениями (кроме фитогормонов) по WPM [2, 4], Андерсона [2, 4] и MS [1, 2], содержащей разные концентрации 6-БАП, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

1. Контроль – MS без фитогормонов;
2. MS + 1,0 мг/л 6-БАП;
3. MS + 1,5 мг/л 6-БАП;
4. MS + 2,0 мг/л 6-БАП;
5. Контроль – WPM без фитогормонов;

6. WPM + 1,0 мг/л 6-БАП;
7. WPM + 1,5 мг/л 6-БАП;
8. WPM + 2,0 мг/л 6-БАП;
9. Контроль – AN без фитогормонов;
10. AN + 1,0 мг/л 6-БАП;
11. AN + 1,5 мг/л 6-БАП;
12. AN + 2,0 мг/л 6-БАП.

Учет анализируемых показателей – высота регенерантов, количество побегов, количество листьев, сырой вес регенеранта, укореняемость регенерантов, количество корней и длина корней – 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 [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 AB-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 «Tisel» *in vitro*. Выделены значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) отличающиеся от показателей анализируемых признаков у регенерантов в соответствующем контроле, на питательной среде без фитогормонов.

Сравнительный анализ высоты регенерантов установил варьирование значений признака в пределах 2,2–2,4 см на питательных средах WPM, MS и Андерсона, без фитогормонов (табл. 1). В присутствии 1–2 мг/л 6-БАП (в зависимости от концентрации) происходило достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение высоты регенерантов в 1,7–1,8 раза на основе MS, в 1,5–1,7 раза на основе WPM и в 1,6–1,8 раза на основе Андерсона (табл. 1). В случае питательных сред WPM и Андерсона, наблюдалась тенденция увеличения показателей признака с ростом концентрации 6-БАП в составе питательной среды. На основе MS показатели признака с ростом концентрации 6-БАП практически не изменялись (табл. 1).

Анализ изменчивости количества побегов у регенерантов, напротив, установил достоверное и существенное увеличение в 1,4–2,1 раза показателей признака на основе MS в присутствии разных концентраций 6-БАП. При этом с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1–2 мг/л количество побегов у регенерантов уменьшалось (табл. 1). Похожая тенденция наблюдалась в присутствии 6-БАП у регенерантов на основе WPM, но при этом показатели признака не превышали достоверно соответствующие показатели в контроле (табл. 1). Изменчивость признака у регенерантов на основе Андерсона установила несущественное и недостоверное увеличение показателей в присутствии 1 и 2 мг/л 6-БАП (табл. 1). В целом, на контрольных средах показатели признака (количество побегов у регенерантов) варьировали в небольшом диапазоне 1,57–1,67 шт.

Анализ изменчивости количества листьев установил незначительное варьирование показателей признака на контрольных средах в пределах 8,7–9,1 шт., в то время как в присутствии разных концентраций 6-БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное превышение показателей над контрольными в 1,3–1,8 раза (табл. 1). Установлена закономерность убывания показателей признака с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1–2 мг/л у регенерантов на основах MS или WPM (табл. 1). На основе Андерсона, напротив, в присутствии 6-БАП, с ростом концентрации фитогормона в пределах 1–2 мг/л, наблюдалось увеличение показателей признака в 1,1–1,4 раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом у регенерантов на основе Андерсона максимальное и достоверное при  $P < 0,05$  превышение контрольных показателей в 1,4 раза наблюдалось в присутствии 2 мг/л 6-БАП. Анализ изменчивости сырого веса регенерантов установил незначительное варьирование признака в пределах 0,12–0,14 г на контрольных средах (табл. 1), в то время как в присутствии разных концентраций 6-БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное увеличение показателей признака в 1,2–2,0 раза (табл. 1). У регенерантов на основе WPM показатели признака в присутствии 6-БАП, традиционно сохранялись на уровне контрольных значений, в то время как на основе

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у регенерантов *Ribes nigrum in vitro*

Вариант опыта	ВП, см		КП, шт.	КЛ, шт	СВР, г	ПУ, %		КК, шт	ДК, см
	СК	ДВ, %				СК	ДВ, %		
MS (контроль)	2,45±0,21	1,63±0,07	1,63±0,07	9,07±0,15	0,13±0,01	100,00±0,01	2,71±0,01	1,53±0,02	
MS +БАП <sub>1,0</sub>	<b>1,46±0,10**</b>	<b>3,33±0,50**</b>	<b>16,03±1,71**</b>	<b>0,26±0,01**</b>	<b>10,00±2,89**</b>	<b>1,75±0,06**</b>	<b>0,90±0,12**</b>		
MS +БАП <sub>1,5</sub>	<b>1,38±0,04**</b>	<b>2,36±0,12*</b>	<b>13,07±0,88**</b>	<b>0,17±0,01**</b>	<b>3,11±1,16**</b>	<b>1,03±0,03**</b>	<b>0,30±0,03**</b>		
MS +БАП <sub>2,0</sub>	<b>1,46±0,08**</b>	<b>2,23±0,09**</b>	<b>11,53±0,61*</b>	<b>0,16±0,01**</b>	0	0	0		
WPM (контроль)	2,24±0,01	1,57±0,09	9,03±1,06	0,12±0,01	76,22±2,32	4,53±0,20	2,07±0,04		
WPM+ БАП <sub>1,0</sub>	<b>1,29±0,09**</b>	2,13±0,35	10,77±0,67	0,12±0,01	0	0	0		
WPM+ БАП <sub>1,5</sub>	<b>1,30±0,13**</b>	1,53±0,09	8,70±0,52	0,12±0,01	0	0	0		
WPM+ БАП <sub>2,0</sub>	<b>1,46±0,17**</b>	1,73±0,38	8,73±1,12	0,12±0,01	0	0	0		
AN (контроль)	2,27±0,23	1,67±0,17	8,77±0,72	0,14±0,01	90,00±2,89	4,76±0,03	2,07±0,04		
AN+ БАП <sub>1,0</sub>	<b>1,26±0,05**</b>	1,97±0,35	10,67±0,57	0,13±0,01	0	0	0		
AN+ БАП <sub>1,5</sub>	<b>1,37±0,12**</b>	1,67±0,22	9,20±0,91	<b>0,11±0,01**</b>	0	0	0		
AN+ БАП <sub>2,0</sub>	<b>1,41±0,04**</b>	1,97±0,38	<b>11,87±1,19*</b>	<b>0,16±0,01**</b>	0	0	0		
НСР <sub>0,05</sub>	0,33	0,75	2,35	0,01	3,53	0,31	0,17		
НСР <sub>0,01</sub>	0,44	1,01	3,15	0,02	4,72	0,42	0,23		

Примечания – \* – достоверно отличается от контроля при  $P<0,05$ ; \*\* – при  $P<0,01$ ; нуль “0” обозначает отсутствие данных; ВР – высота регенерантов, см; КП – количество побегов, шт; КЛ – количество листов, шт; СВР – сырой вес регенеранта, г; ПУ – процент укореняемости, %; КК – количество корней, шт; ДК – длина корней, см; НСР – наименьшая существенная разница при уровнях значимости  $P<0,05$  и  $P<0,01$ ; MS – среда Мурасиге-Скуга; WPM – среда woody plant medium; AN – среда Андерсона; БАП – 6-бензиламинопурин; то же для таблицы 2

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов *Ribes nigrum in vitro*

ИВ	df	ВП		КП		КЛ		СВР		ПУ		КК		ДК	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	26	0,03	100,00	0,46	100,00	7,09	100,00	0,01	100,00	12,69	100,00	0,38	100,00	0,09	100,00
Фактор А	2	0,02	6,60	<b>1,98**</b>	33,00	<b>41,07**</b>	44,60	<b>0,02**</b>	57,10	<b>57,29**</b>	34,70	<b>2,58**</b>	52,50	<b>0,48**</b>	41,70
Фактор В	2	0,03	8,80	<b>0,98*</b>	16,30	<b>12,01*</b>	13,00	<b>0,01**</b>	14,60	<b>26,19**</b>	15,90	<b>0,77**</b>	15,70	<b>0,21**</b>	18,20
АХВ	4	0,01	6,60	0,24	7,90	6,62	14,40	<b>0,01**</b>	27,90	<b>26,19**</b>	31,80	<b>0,77**</b>	31,50	<b>0,21**</b>	36,50
Повторности	2	0,02	7,00	1,16	19,30	5,02	5,40	0,01	0,30	1,00	0,60	0,01	0,10	0,01	0,20
Случайные отклонения	16	0,03	71,00	0,18	23,50	2,60	22,60	0,01	0,10	3,50	17,00	0,01	0,20	0,01	3,40

Примечания – ИВ – источник варьирования; df – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – состав среды (MS – среда Мурасиге-Скуга; WPM – среда woody plant medium; AN – среда Андерсона); фактор В – концентрация 6-БАП (1,0; 1,5; 2,0 мг/л).

\* – значимо при  $P<0,05$ ;

\*\* – при  $P<0,01$ .

Андерсона, с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1,0–1,5 мг/л уменьшались в 1,1–1,3 раза (достоверно при  $P < 0,01$ , в случае 1,5 мг/л 6-БАП), а при дальнейшем увеличении концентрации 6-БАП до 2 мг/л достоверно при  $P < 0,01$  превышали показатели в контроле в 1,2 раза (табл. 1).

Сравнительный анализ укореняемости регенерантов на контрольных питательных средах разного состава, без фитогормонов, установил наиболее высокие показатели признака у регенерантов на основе MS (100%), в то время как на основе Андерсона укореняемость регенерантов составила 90%, а на основе WPM – всего 76% (табл. 1). Таким образом, для максимальной укореняемости регенерантов смородины черной *in vitro* рекомендуется полная, питательная среда на основе MS, без фитогормонов. В присутствии цитокинина 6-БАП наблюдалось ожидаемое прекращение формирования корней [2] у регенерантов смородины черной, но этот процесс происходил по-разному, в зависимости от используемой основы питательной среды (табл. 1). Так у регенерантов на основах WPM и Андерсона в присутствии 6-БАП образования корней не наблюдалось. В то же время у регенерантов на основе MS в присутствии 1,0–1,5 мг/л 6-БАП происходило образование корней в 3–10% случаев, а при 2 мг/л 6-БАП образования корней уже не наблюдалось (табл. 1).

Несмотря на уменьшение показателей укореняемости регенерантов на основе контрольной питательной среды WPM или Андерсона, по сравнению с контрольной средой MS, показатели количества корней и длины корней у регенерантов на WPM и Андерсона были достоверно при  $P < 0,01$  выше, соответственно, в 1,7–1,8 раза и в 1,4 раза, по сравнению с соответствующими показателями у регенерантов на MS (табл. 1). В присутствии 1,0–1,5 мг/л 6-БАП у регенерантов на основе MS происходило достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение количества корней в 1,6–2,6 раза, и длины корней – в 1,7–5,1 раза, обратно пропорционально росту концентрации 6-БАП (табл. 1).

Двухфакторный дисперсионный анализ установил высокодостоверное при  $P < 0,01$  влияние исследуемых факторов (основа питательной среды и концентрации 6-БАП) по отдельности, а также их совокупности на изменчивость признаков «сырой вес регенеранта», «укореняемость регенерантов», «количество корней» и «длина корней у регенерантов» (табл. 2). При этом доли влияния исследуемых факторов составили, соответственно, 15–57%, 16–35%, 16–53% и 18–42%. Наиболее высокими долями влияния на изменчивость всех анализируемых признаков обладал фактор «основа питательной среды» (табл. 2).

Основа питательной среды и концентрации 6-БАП оказывали достоверное (при  $P < 0,01$  и  $P < 0,05$ , соответственно) влияние на изменчивость признаков «количество побегов» и «количество листьев» у регенерантов, с долями влияния факторов 16–33% и 13–45% соответственно анализируемым признакам (табл. 2).

В единственном случае достоверность влияния исследуемых факторов и их совокупности на изменчивость признака «высота регенерантов» не установлена (табл. 2).

**Выводы.** Сравнительный анализ изменчивости показателей исследуемых признаков указывает на то, что питательная среда на основе MS во всех случаях способствует проявлению достоверной и существенной изменчивости всех признаков в присутствии 1–2 мг/л 6-БАП.

Варьирование значений некоторых анализируемых признаков у регенерантов на контрольных питательных средах WPM, MS и Андерсона, без фитогормонов, наблюдалось в незначительных пределах: 2,2–2,4 см по высоте регенерантов; 1,6–1,7 шт. по количеству побегов у регенерантов; 8,7–9,0 шт. по количеству листьев у регенерантов; 0,12–0,14 г по сырому весу регенерантов.

В присутствии 1–2 мг/л 6-БАП происходило достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение высоты регенерантов в 1,7–1,8 раза на основе MS, в 1,5–1,7 раза на основе WPM и в 1,6–1,8 раза на основе Андерсона. При этом в случае питательных сред WPM и Андерсона, наблюдалась тенденция увеличения высоты регенерантов с ростом концентрации 6-БАП в составе питательной среды.

Установлено, что с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1–2 мг/л количество побегов у регенерантов на основе MS уменьшалось, но при этом все показатели превышали соответствующие показатели в контроле в 1,4–2,1 раза.

Установлена закономерность убывания показателей количества листьев с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1–2 мг/л у регенерантов на основах MS или WPM, в то время как на основе Андерсона с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1–2 мг/л наблюдалось увеличение показателей признака в 1,1–1,4 раза по сравнению с контролем. В присутствии разных концентраций 6-БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное превышение показателей количества листьев над контрольными в 1,3–1,8 раза.

Установлено, что в присутствии разных концентраций 6-БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное увеличение показателей признака «сырой вес регенерантов» в 1,2–2,0

раза, в то время как на основе Андерсона, с ростом концентрации 6-БАП в пределах 1,0–1,5 мг/л показатели признака уменьшались в 1,1–1,3 раза (достоверно при  $P < 0,01$ , в случае 1,5 мг/л 6-БАП), а при дальнейшем увеличении концентрации 6-БАП до 2 мг/л достоверно при  $P < 0,01$  превышали показатели в контроле в 1,2 раза.

Сравнительный анализ укореняемости регенерантов на контрольных питательных средах разного состава, без фитогормонов, установил наиболее высокие показатели признака у регенерантов на основе MS (100%), в то время как на основе Андерсона укореняемость регенерантов составила 90%, а на основе WPM – всего 76%. Несмотря на уменьшение показателей укореняемости регенерантов на основе контрольной питательной среды WPM или Андерсона, по сравнению с контрольной средой MS, показатели количества корней и длины корней у регенерантов на WPM и Андерсона были достоверно при  $P < 0,01$  выше, соответственно, в 1,7–1,8 раза и в 1,4 раза, по сравнению с соответствующими показателями у регенерантов на MS.

В присутствии 1,0–1,5 мг/л 6-БАП у регенерантов на основе MS происходило образование корней только в 3–10% случаев, по сравнению с контролем, а также наблюдалось достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение количества корней в 1,6–2,6 раза, и длины корней – в 1,7–5,1 раза, обратно пропорционально росту концентрации 6-БАП. Во всех остальных случаях в присутствии 6-БАП процесс образования корней у регенерантов прекращался.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил в большинстве случаев высокодостоверное при  $P < 0,01$  влияние исследуемых факторов «основа питательной среды» и «концентрация 6-БАП» на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением высоты регенерантов, с долями влияния от 13–57%, в зависимости от признака.

Установлено высокодостоверное при  $P < 0,01$  влияние совокупности факторов «основа питательной среды» и «концентрация 6-БАП» на изменчивость признаков «сырой вес регенеранта», «укореняемость регенерантов», «количество корней» и «длина корней у регенерантов» с долями влияния 28%, 32%, 31% и 37% соответственно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lambardi, M. Protocol for micropropagation of selected economically–important horticultural plants / M. Lambardi, E. Ozudogru, S. Jain. – Springer Protocols: Humana press, 2013. – 490 p.
2. 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.
3. Кудряшова, О.А. Метод стабильного введения сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. в культуру in vitro / О.А. Кудряшова, А.А. Волотович // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 2. – С. 40–43.
4. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово–ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас – Минск, 1996. – 246 с.
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.

**THE ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS AT «TISEL»  
CULTIVAR OF *RIBES NIGRUM* REGENERANTS  
IN VITRO ON MEDIA OF DIFFERENT STRUCTURE IN THE PRESENCE  
OF 6-BENZILAMINOPURIN**

***T.P. KUNAKHOVETS, O. A. KUDRYASHOVA, A.A. VOLOTOVICH***

*Summary*

Results of the comparative analysis of variability of seven quantitative traits of blackcurrant regenerants of «Tisel» cultivar *in vitro* on nutrient, agarized mediums of WPM, Anderson and MS, in the presence of 1–2 mg per liter of 6-benzilamino-purin are given in the present article. It is thus established reliable reduction of height of regenerants: by 1.7–1.8 times on the basis of MS; by 1.5–1.7 times on the basis of WPM and by 1.6–1.8 times on the basis of Anderson. At regenerants on the basis of MS in relation to indicators in control there is established the reliable increase in number of escapes by 1.4–2.1 times, quantities of leaves by 1.3–1.8 times and the crude weight of regenerants – by 1.2–2.0 times. Results of variability of regenerants rooting percentage, quantities and lengths of roots are given. Tendencies and regularities of variability of all analyzed traits with growth of concentration of 6-BAP within 1–2 mg per liter are established. Results of the dispersive analysis of data are provided.

© Кунаховец Т.П., Кудряшова О.А., Волотович А.А.

*Поступила в редакцию 14 апреля 2014г.*