

СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ *RHODODENDRON JAPONICUM* L. IN VIVO ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БРАССИНОСТЕРОИДОВ

О.А. КУДРЯШОВА¹, А.А. ВОЛОТОВИЧ¹, Т.В. ГЕРАСИМОВИЧ¹,
М.П. ВОДЧИЦ¹, В.А. ХРИПАЧ²

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Рододендрон (*Rhododendron*) – род растений семейства Вересковые (*Ericaceae*). Рододендрон – декоративный, вечнозеленый, либо полувечнозеленый, либо листопадный кустарник средней высотой 2 м, реже – невысокое дерево. Рододендроны представляют самый многочисленный род в семействе Вересковых. Рододендроны медленно растут, долговечны и способны сохранять высокую декоративность на протяжении десятков лет. Род насчитывает около 1300 дикорастущих видов, из которых в садоводстве используют более 600 видов, и 8000 сортов. Более 100 сортов широко применяются в озеленении. Для успешного роста им требуется кислая (pH=4–5), питательная, богатая гумусом, микро- и макроэлементами, рыхлая, воздухо- и водопроницаемая почва [1–3]. В растениях, особенно в верхушечных соцветиях рододендрона, содержится до 0,3% эфирного масла, которое используется в композициях высших сортов парфюмерии [4].

Брассиностероиды – группа природных регуляторов роста растений, производные ненасыщенных оксистероидов с лактонной группой в кольце В [5]. Ускоряют рост растений, при этом механизм действия отличен от такового других фитогормонов. Брассиностероиды усиливают реакцию геотропизма, способствуют дифференциации ксилемы, повышают жизнеспособность пыльцы, задерживают старение листьев, регулируют угол наклона листьев, повышают устойчивость растений к стрессу [6, 7]. Брассиностероиды содержатся в микроколичествах во всех органах высших и низших растений, наибольшие концентрации отмечены в пыльце. Синтезируются из широко распространенного в растениях тетрациклического тритерпена кампестерола. Наиболее известным представителем является брассинолид, выделенный в 1979 Дж. Митчелом и др. из пыльцы рапса (*Brassica napus* L.). На сегодняшний день установлено, что, во-первых, брассиностероиды индуцируют экспрессию генов ксилоглюкан-эндотрансглюкозилаз – ферментов, перестраивающих полисахаридные полимеры клеточных стенок так, что клеточная стенка временно размягчается, и благодаря этому клетки растут. Во-вторых, брассиностероиды стимулируют биосинтез фитогормона этилена [7].

Целью настоящих исследований являлась оценка возможности использования брассиностероидов для ускорения развития и повышения жизнеспособности в условиях стресса у растений рододендрона японского *Rhododendron japonicum* L. на этапе адаптации *in vivo*.

Методика и объекты исследования. Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории сектора микроклонального размножения растений УО «Полесский государственный университет» за период август-сентябрь 2009 года по схеме, приведенной в таблице 1.

В качестве объекта исследований использовали растения листопадного вида рододендрон японский *Rhododendron japonicum* L. Семена высевали на торфянистый грунт для азалий, увлажняли из распылителя и прикрывали пленкой до появления всходов, а затем и первых настоящих листьев у растений. Всходы проветривали дважды в день по 30 минут каждый раз. При появлении плесени на поверхности субстрата использовали измельченный активированный уголь для присыпания очагов. Всходы культивировали на световой установке при соблюдении следующих условий: фотопериод (свет/темнота, ч) – 16/8 часов, температура +25±1°C, люминесцентные лампы OSRAM L36W/954 Lumilux de Lux, освещенность 9000 люкс.

Пикировку семян по отдельности производили в возрасте 50 дней в емкости объемом 100 мл, заполненные оптимальным для роста и развития растений субстратом (pH=4,0ч4,5), либо ионообменным субстратом «Биона-312» с pH=6,5. При проведении эксперимента для каждого варианта опыта отбирали наиболее жизнеспособные сеянцы – по 50 растений-сеянцев, распикированных в смесь торфа, хвойного опада и песка (в соотношении 1:1:1), и по 19 растений, распикированных в ионообменный субстрат «Биона-312» (табл. 1).

Растения обрабатывали при помощи распылителя растворами brassinosterоидов при выключенных лампах световой установки и не включали лампы до полного высыхания растворов на листьях рододендрона. Обрабатывать растворами brassinosterоидов начинали 65-дневные растения. Обработку повторяли каждые семь дней на протяжении полутора месяцев. Кратность обработок за указанный период времени составила 5.

Перед каждой обработкой и в начале эксперимента измеряли высоту растений, учитывали количество настоящих листьев, количество появляющихся почек и боковых побегов. Отмечали окраску и размеры листьев, количество жизнеспособных растений. Количество измерений, включая исходные данные до обработки растений, составило 6.

При статистической обработке данных использовали прирост высоты растений и прирост количества настоящих листьев, измеряемые в процентах по отношению к изначальным (контрольным) замерам.

Таблица 1 – Схема эксперимента по изучению стимуляции brassinosterоидами роста и развития растений *Rhododendron japonicum* L. in vivo

Вариант опыта	Субстрат	Доза, мкг д.в. на 1 растение	Количество растений
Вода дистиллированная (контроль)	Торф:песок:хвойный опад	0,000	50
Раствор эпибрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,500	50
Раствор эпибрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,050	50
Раствор эпибрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,005	50
Раствор гомобрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,500	50
Раствор гомобрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,050	50
Раствор гомобрасинолида	Торф:песок:хвойный опад	0,005	50
Вода дистиллированная (контроль)	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,000	22
Раствор эпибрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,500	19
Раствор эпибрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,050	19
Раствор эпибрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,005	19
Раствор гомобрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,500	19
Раствор гомобрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,050	19
Раствор гомобрасинолида	Ионообменный субстрат «Биона-312»	0,005	19

В эксперименте использовали растворы исследуемых соединений, эпибрасинолида и гомобрасинолида, из расчета 0,500 мкг, 0,050 мкг и 0,005 мкг действующего вещества на одно растение. Схема эксперимента приведена в таблице 1.

Brassinosterоиды (по 10 мг каждого) предварительно растворяли в 1 мл 96% этилового спирта. В дальнейшем готовили маточные растворы и растворы для обработки растений, исходя из варианта опыта.

Для обработки одного растения использовали 2 мл водного раствора, содержащего исследуемую дозу brassinosterоида. Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [8], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [9].

Дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе АВ-Stat, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований приведены в таблицах 2–5. Согласно данным, приведенным в таблице 2, достоверные отличия от контрольных растений по признаку количество настоящих листьев на субстрате Биона-312 наблюдали через 7 дней после первой обработки растений растворами эпибрасинолида во всех исследуемых случаях.

Таблица 2 – Изменчивость (в %) высоты растений (ВР) и количества настоящих листьев (КНЛ) у *Rhododendron japonicum* L. в зависимости от кратности обработки (1Ч, 2Ч, 3Ч, 4Ч, 5Ч) растворами БС

Вариант	ВР, 1Ч	КНЛ, 1Ч	ВР, 2Ч	КНЛ, 2Ч	ВР, 3Ч	КНЛ, 3Ч	ВР, 4Ч	КНЛ, 4Ч	ВР, 5Ч	КНЛ, 5Ч
Контроль, Б-312	9,93	11,19	29,61	22,55	48,46	38,55	49,02	38,55	48,09	48,30
Б-312, ЭБ 0,005	8,67	0,00**	33,45	16,39	44,99	27,61	51,95	37,12	58,33	55,50
Б-312, ЭБ 0,050	12,95	0,46**	25,84	9,74**	36,97	14,90**	42,84	15,69**	45,92	25,60**
Б-312, ЭБ 0,500	12,86	0,00**	29,04	12,56*	50,12	29,56	52,40	31,37	54,50	42,93
Б-312, ГБ 0,005	2,72	15,25	19,56	28,95	31,54	34,48	37,64	40,26	31,58	68,23*
Б-312, ГБ 0,050	2,72	14,39	29,35	21,15	35,89	28,85	38,39	32,87	42,54	56,22
Б-312, ГБ 0,500	2,68	13,79	29,39	23,02	35,85	30,06	38,28	35,26	43,36	46,63
НСР₀₅	8,30	6,13	14,99	7,96	19,49	11,31	19,56	13,10	19,31	16,75
НСР₀₁	10,97	8,09	19,80	10,52	25,75	14,94	25,84	17,30	25,51	22,13
Контроль, грунт	19,71	21,95	42,90	45,85	57,21	62,13	75,47	76,47	85,47	95,54
грунт, ЭБ 0,005	66,22**	34,81**	116,00**	57,45*	139,77**	75,52*	188,41**	95,24*	204,85**	117,24*
грунт, ЭБ 0,050	38,73**	33,20*	49,67	54,93	111,38**	82,72**	159,23**	113,91**	192,37**	144,78**
грунт, ЭБ 0,500	37,73**	33,69*	45,44	60,68*	102,59**	85,49**	143,88**	109,09**	163,75**	142,26**
грунт, ГБ 0,005	31,83	28,66	71,02**	55,17	104,05**	73,68	150,78**	97,91**	187,62**	121,63**
грунт, ГБ 0,050	35,65*	28,38	45,49	47,16	67,82	76,41*	125,55**	103,72**	153,39**	124,42**
грунт, ГБ 0,500	33,68*	32,49*	40,40	54,44	76,93*	78,39*	127,78**	107,28**	150,78**	133,09**
НСР₀₅	13,32	8,97	17,48	11,02	19,60	12,53	27,94	15,02	34,33	17,27
НСР₀₁	17,50	11,79	22,97	14,48	25,76	16,47	36,71	19,73	45,11	22,70

Примечание – * – достоверно отличается от контроля при $P < 0,05$; ** – при $P < 0,01$; варианты: ЭБ 0,005 – элибрасинолид, доза 0,005 мкг на 1 растение; ЭБ 0,050 – элибрасинолид, доза 0,050 мкг на 1 растение; ЭБ 0,500 – элибрасинолид, доза 0,500 мкг на 1 растение; ГБ 0,005 – гомобрасинолид, доза 0,005 мкг на 1 растение; ГБ 0,050 – гомобрасинолид, доза 0,050 мкг на 1 растение; ГБ 0,500 – гомобрасинолид, доза 0,500 мкг на 1 растение; Б-312 – ионообменный субстрат Биона-312; грунт – смесь торфа, хвойного опада и песка в соотношении 1:1:1

При этом количество настоящих листьев практически не менялось, в то время как среди контрольной группы растений, в среднем, наблюдали прирост на 11,19%; а среди растений, обрабатываемых растворами гомобрассинолида, – прирост на 13,79-15,25% по данному признаку.

Следует отметить, что достоверные (при $P < 0,01$) отличия от контроля по признаку количество настоящих листьев наблюдали на протяжении всего эксперимента (35 дней) при обработке растений раствором ЭБ в дозе 0,05 мкг на 1 растение.

При этом прирост по признаку среди опытных растений был достоверно ниже прироста среди растений в контроле.

Напротив, обработка растений растворами гомобрассинолида во всех указанных дозах приводила к повешению прироста по данному признаку по отношению к контрольным растениям, достоверному (при $P < 0,05$) только в одном случае – при пятикратной обработке растений раствором гомобрассинолида в дозе 0,005 мкг на 1 растение.

Курсивом в таблице 2 отмечены достоверные различия по показателям прироста по исследуемым признакам для опытных растений. При этом, достоверно различаясь между собой по исследуемым показателям, опытные растения в большинстве случаев несущественно отличались от контрольных.

В таблице 2 приведены также результаты изменчивости растений по указанным признакам на специально приготовленном смесевом торфянистом субстрате при обработке растворами разных БС в исследуемых дозах (табл. 1).

В отличие от выше охарактеризованной части эксперимента с использованием ионообменного субстрата Биона-312, обработка растений растворами эпи- и гомобрассинолида в исследуемых дозах приводила к достоверному увеличению прироста показателей исследуемых признаков в подавляющем большинстве случаев.

Обработка растений растворами ЭБ в дозах 0,005 и 0,050 мкг на 1 растение приводила к достоверно более выраженному усилению роста растений; а в случае с ЭБ в дозе 0,050 мкг на 1 растение – к достоверно более выраженному увеличению количества настоящих листьев у растений.

В таблице 3 приведены данные по изменению жизнеспособности растений на протяжении эксперимента. Ионообменный субстрат Биона-312 является стрессовым фактором для растений рода *Rhododendron* поскольку имеет $pH=6,5$.

В то же время оптимальная pH для роста и развития растений данного рода составляет 4,0.

Таблица 3 – Жизнеспособность растений *Rhododendron japonicum* L. через 35 дней после начала эксперимента

Вариант опыта	Жизнеспособность растений, %
Контроль (Биона-312)	54,2
Биона-312; ЭБ 0,005	100,0
Биона-312; ЭБ 0,050	94,7
Биона-312; ЭБ 0,500	94,7
Биона-312; ГБ 0,005	94,7
Биона-312; ГБ 0,050	100,0
Биона-312; ГБ 0,500	94,7
Контроль (Грунт)	96,0
Грунт; ЭБ 0,005	98,0
Грунт; ЭБ 0,050	100,0
Грунт; ЭБ 0,500	100,0
Грунт; ГБ 0,005	100,0
Грунт; ГБ 0,050	98,0
Грунт; ГБ 0,500	100,0

Примечание – ЭБ 0,005 – эпибрассинолид, доза 0,005 мкг на растение; ЭБ 0,050 – эпибрассинолид, доза 0,050 мкг на растение; ЭБ 0,500 – эпибрассинолид, доза 0,500 мкг на растение; ГБ 0,005 – гомобрассинолид, доза 0,005 мкг на растение; ГБ 0,050 – гомобрассинолид, доза 0,050 мкг на растение; ГБ 0,500 – гомобрассинолид, доза 0,500 мкг на растение; Б-312 – ионообменный субстрат Биона-312; грунт – смесь торфа, хвойного опада и песка в соотношении 1:1:1

Таблица 4 – Трехфакторный дисперсионный анализ высоты растений (ВР) и количества настоящих листьев (КНЛ) у *Rhododendron japonicum* L. в зависимости от кратности обработки (1Ч, 2Ч, 3Ч, 4Ч, 5Ч) растворами БС

Источник варьирования	Степени свободы	Средние квадраты											
		ВР, 1Ч	КНЛ, 1Ч	ВР, 2Ч	КНЛ, 2Ч	ВР, 3Ч	КНЛ, 3Ч	ВР, 4Ч	КНЛ, 4Ч	ВР, 5Ч	КНЛ, 5Ч		
Общее	215	1211,4	537,5	2106,6	928,2	2331,9	1446,8	5579,5	2522,0	7692,3	3393,6		
Фактор А (субстрат)	1	38453,6**	36947,3**	31956,9**	82520,5**	146847,1**	160032,3**	475173,0**	324454,4**	720716,5**	429936,9**		
Фактор В (вид БС)	1	13202,2**	2378,6**	15684,6**	1040,7	36226,3**	74,4	38848,5**	1306,7	39034,3**	1068,9		
АЧВ	1	2535,4	3187,2**	10134,7*	2711,9*	14350,9**	1899,4	13587,1*	535,8	12816,0	6815,5*		
Фактор С (доза БС)	2	541,9	1026,9	11080,3**	4082,8**	5266,8*	3210,8*	4742,5	2607,6	1493,3	2758,6		
АЧС	2	1038,6	1070,1*	12870,9**	821,3*	3225,4	682,8	2234,6	1386,3	289,4	8372,0**		
ВЧС	2	4143,8*	134,7	14254,1**	4,1	2778,6	301,4	7006,5	365,0	8076,8	922,9		
АЧВЧС	2	5596,6**	222,2	6424,0*	28,5	2212,7	134,4	5702,4	229,2	4584,2	1513,1		
Повторности	17	660,3	121,8	1323,6	223,6	1254,0	404,0	3062,2	564,2	3622,5	726,5		
Случайные отклонения	187	921,9	353,4	1515,4	522,0	1367,2	714,0	3104,5	1054,4	4228,9	1349,3		

Примечание – * – значимо при $P < 0,05$; ** – значимо при $P < 0,01$

Таблица 5 – Четырехфакторный дисперсионный анализ (средние квадраты) высоты растений (ВР) и количества настоящих листьев (КНЛ) у *Rhododendron japonicum* L.

Источник варьирования	Степени свободы	ВР	КНЛ
Общее	1079	4742,308	2406,771
Фактор А (субстрат)	1	1054641,000**	886058,400**
Фактор В (БС)	1	136172,100**	5024,256**
АЧВ	1	50118,200**	13294,060**
Фактор С (доза БС)	2	16341,970**	12596,550**
АЧС	2	12669,140**	6278,388**
ВЧС	2	33077,250**	703,815
АЧВЧС	2	21868,010**	719,634
Фактор D (кратность обработки)	4	262190,000**	174712,300**
АЧD	4	89626,650**	36958,280**
ВЧD	4	1705,984	211,263
АЧВЧD	4	826,472	463,960
СЧD	8	1695,774	272,548
АЧСЧD	8	1747,440	1763,560*
ВЧСЧD	8	795,626	256,085
АЧВЧСЧD	8	662,978	351,949
Повторности	17	7154,454	1573,498
Случайные отклонения	1003	2123,499	752,390

Примечание – * значимо при $P < 0,05$; ** значимо при $P < 0,01$

Результаты исследований показали, что обработка растений растворами БС в указанных дозах приводит к повышению жизнеспособности растений исследуемого вида в стрессовых условиях в 1,75-1,85 раза, а при оптимальных значениях рН на торфянистом субстрате – в 1,02-1,04 раза.

В таблице 4 приведены результаты трехфакторного дисперсионного анализа изменчивости исследуемых признаков в зависимости от кратности обработки растений растворами brassinosteroidов в указанных согласно схеме эксперимента 1 дозах (табл. 1).

Согласно полученным данным, во всех случаях изменчивость признаков достоверно (при $P < 0,01$) зависела от типа субстрата (фактор А). Вид БС (фактор В), а также совокупность двух упомянутых факторов (субстрат × вид БС) также оказывали достоверное влияние на изменчивость исследуемых признаков. Доза brassinosteroidов (фактор С) оказывала достоверное влияние на изменчивость исследуемых признаков после 2-х–3-х обработок растений.

В таблице 5 приведены данные четырехфакторного дисперсионного анализа исследуемых признаков с учетом добавления фактора «кратность обработки». Согласно полученным данным, все исследуемые факторы («тип субстрата», «вид brassinosteroidов», «доза brassinosteroidов», «кратность обработки»), а также, в большинстве случаев, попарное их сочетание оказывают высокодостоверное (при $P < 0,01$) влияние на изменчивость исследуемых признаков.

Выводы

1. Обработка растений на торфянистом субстрате растворами ЭБ в дозах 0,005 и 0,050 мг д.в. на 1 растение приводила к достоверно более выраженному усилению роста растений в 2,40-3,35 раза и в 1,94-2,25 раза соответственно; а в случае с ЭБ в дозе 0,050 мг д.в. на 1 растение – к достоверно более выраженному увеличению количества настоящих листьев у растений в 1,51 раза.

2. Обработка растений растворами БС приводит к повышению жизнеспособности растений *Rhododendron japonicum* L. в стрессовых условиях на ионитном субстрате Биона-312 в 1,75-1,85 раза, а при оптимальных значениях рН на торфянистом субстрате – в 1,02-1,04 раза.

3. Трехфакторный дисперсионный анализ установил достоверное влияние типа субстрата, вида brassinosteroidа и совокупности данных факторов на изменчивость исследуемых признаков. Доза brassinosteroidов оказывала достоверное влияние на изменчивость исследуемых признаков после 2-х–3-х обработок растений.

4. Четырехфакторный дисперсионный анализ установил, что исследуемые факторы «тип субстрата», «вид brassinosteroidов», «доза brassinosteroidов», «кратность обработки», а также, в большинстве случаев, попарное их сочетание оказывают высокодостоверное (при $P < 0,01$) влияние на изменчивость признаков «высота растений» и «количество настоящих листьев».

5. Результаты исследований свидетельствуют о том, что применение определенных концентраций brassinosteroidов приводит к достоверной стимуляции роста и развития, а также к повышению жизнеспособности у растений *Rhododendron japonicum* L. в стрессовых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коновалова, Т.Ю. Декоративные деревья и кустарники : атлас-определитель / Т.Ю. Коновалова, Н.А. Шевырева. – М.: Фитон, 2008. – 208 с.
2. Сауткина, Т.А. Определитель высших растений Беларуси / Т.А. Сауткина; под ред. В.И. Парфенова. – Минск : Дизайн Про, 1999. – 471 с.
3. Федоров, А.А. Жизнь растений. Т.5. Ч.2. Цветковые растения / А.А. Федоров; под ред. А. Л. Тахтаджяна. – М.: Просвещение, 1981. – 576 с.
4. Хейфиц, Л.А. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии / Л.А. Хейфиц, В.М. Дашунин. – М.: Химия, 1994. – 226 с.
5. Khripach, V.A. Synthesis of brassinosteroids / V.A. Khripach // Pure & Apply Chem. – 1990. – V.62, I. 7. – P. 1319–1324.
6. Хрипач, В.А. Брассиностероиды / В.А. Хрипач, Ф.А. Лахвич, В.Н. Жабинский. – Минск : Навука і тэхніка, 1993. – 287 с.
7. Khripach, V.A. Brassinosteroids. A new class of plant hormones / V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, A.E. Groot. – San Diego : Academic Press, 1999. – 456 p.
8. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб : Питер, 2001. – 688 с.
9. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.

ACCELERATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF RHODODENDRON JAPONICUM L. PLANTS IN VIVO USING OF BRASSINOSTEROIDS

***O.A. KUDRYASHOVA, A.A. VOLOTOVICH, T.V. GERASIMOVICH,
M.P. VODCHIC, V.A. KHRYPACH***

Summary

The results of the comparative analysis of efficiency of epi – and homobrassinolide using for stimulation of growth and development of *Rhododendron japonicum* L. plants at an adaptation stage *in vivo* are presented in the article. Research work spent on a peaty soil with optimum value of pH, and on ion exchange nutrient substrate «Biona-312» with the raised values of pH. Authentic maximum increase of plant growth in 2.40-3.35 times and in 1.94-2.25 times, accordingly, is established at treating of plants by solutions of epi brassinolide with 0.005 and 0.050 microgram of reactant on a plant. The four-factorial dispersive analysis has established that all of investigated factors («substrate type», «a kind of brassinolids», «a dose of brassinolids», «frequency rate of treating»), as well as in the most cases their paired combination render authentic (at $P < 0.01$) influence on variability of height of plants and quantity of the present leaves.

© Кудряшова О.А., Волотович А.А., Герасимович Т.В., Водчиц М.П., Хрипач В.А.

Поступила в редакцию 10 марта 2011г.