

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВЫСОТЫ
И КОЭФФИЦИЕНТА РАЗМНОЖЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ
VACCINIUM CORYMBOSUM L. IN VITRO
ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ**

О.А. КУДРЯШОВА, Т.В. ГЕРАСИМОВИЧ, А.А. ВОЛОТОВИЧ, Т.А. СЕНЬКОВЕЦ

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь*

Введение. Современная биотехнология – это наука и отрасль производства, основу которой составляют ДНК- и клеточные технологии. Клеточные технологии в растениеводстве, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, применяются для создания генетического разнообразия растительного мира (соматональная изменчивость, соматическая гибридизация, мутагенез на клеточном уровне, генетическая трансформация растений), в частности, для ускоренного создания новых сортов и видов растений; а также для ускоренного, вегетативного размножения растительных форм с желаемыми признаками, основанного на использовании техники клонального микроразмножения растений *in vitro* [1–8].

Голубика высокая *Vaccinium corymbosum* L. – перспективный вид для культивирования в Республике Беларусь, особенно в условиях ее южной агроклиматической зоны [9]. Клональное микроразмножение видов рода *Vaccinium* является экономически выгодным и рассматривается как один из основных промежуточных этапов современной технологии ускоренного производства качественного посадочного материала [1, 7, 8, 10].

Важнейшим процессом, влияющим на продуктивность растений, является фотосинтез. Воздействие излучения различного спектрального состава и интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР) на фотосинтез, фотоморфогенез, рост и развитие, другие процессы, определяющие продуктивность растений, достаточно хорошо изучены в 20-м веке [11, 12]. Создание новых источников света для выращивания растений в условиях искусственного освещения осложняется тем, что на фоне различного соотношения синих и зеленых лучей должно быть повышенным содержание красных лучей в спектре ФАР. Эта проблема исчезает с появлением светодиодов. Светодиод – это полупроводниковый прибор с электронно-дырочным р–п переходом или контактом «металл-полупроводник», преобразующий электрический ток непосредственно в световое излучение в относительно узкой полосе спектра, ширина которой составляет 20–30 нм [13]. Узкая ширина спектра излучения позволяет использовать светодиоды для формирования светильников со специальным спектром активации фотофизиологических процессов у растений.

В статье приведены результаты испытаний созданного опытного образца светодиодной лампы и сравнительного анализа эффективности использования световых установок с разным типом ламп для стимуляции роста и развития регенерантов разных сортов голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*.

Методика и объекты исследования. В качестве объекта исследований использовали регенеранты двух сортов (Brigitta blue и Bluejay) голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L., введенные в культуру *in vitro* и размножаемые микроклонально *in vitro* с 2009 года на базе сектора микроклонального размножения растений ПолесГУ.

В качестве экспланта для формирования регенеранта использовали фрагмент побега, состоящий из двух метамеров. Регенеранты в колбах объемом по 100 мл, содержащими по 20 мл агаризованной питательной среды для размножения [2], размещали на стеллажах световой установки биотехнологической лаборатории, при освещении либо оригинальными светодиодными лампами (4000 лк) [8], либо люминесцентными лампами OSRAM L36W/76 Natura (6000 лк) при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) и при температуре 24±1⁰С. Продолжительность эксперимента охватила весенний период с 01 марта по 07 июня 2010 г. Пассажи регенерантов исследуемых сортов и учет количественных признаков проводили через 6 недель культивирования *in vitro*. Общее количество пассажей регенерантов каждого исследуемого сорта (включая повторности) за указанный период

составило 5. Анализировали изменчивость следующих признаков: «высота регенерантов», «коэффициент размножения/побеги» (как количество развившихся побегов из одного экспланта) и «коэффициент размножения/экспланты» (как количество полноценных эксплантов для последующего размножения, получаемое после черенкования побегов, развившихся у одного регенеранта). Высоту регенерантов измеряли с помощью миллиметровой бумаги.

Количество анализируемых регенерантов сорта Brigitta blue при освещении светодиодными лампами и люминесцентными лампами составило 553 и 502, соответственно; для сорта Bluejay – 165 и 94 соответственно (табл. 1).

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [14] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [15]. Дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе AB-Stat, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси.

Результаты и их обсуждение. Результаты биометрического анализа изменчивости признака «высота регенерантов» приведены в таблице 1. Согласно полученным данным, средняя высота регенерантов двух исследуемых сортов голубики высокой, культивируемых *in vitro* при освещении светодиодными лампами достоверно (при $P < 0,01$) превышала таковую у регенерантов, культивируемых *in vitro* при освещении люминесцентными лампами указанного выше типа на 3,57–11,40 мм и на 2,93–11,02 мм для сортов Brigitta blue и Bluejay, соответственно. Максимальная высота регенерантов Brigitta blue при освещении светодиодными лампами достигала 31,00–33,00 мм, в то время как у регенерантов, освещаемых люминесцентными лампами, в четырех случаях из пяти не превышала 17,00 мм (табл. 1). В целом высота регенерантов Brigitta blue для вариантов опыта со светодиодной и люминесцентной подсветкой варьировала в пределах 7,00–33,00 мм и 4,50–32,00 мм соответственно.

Таблица 1 – Биометрические показатели изменчивости высоты регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Сорт	Тип лампы	Номер колбы	Количество анализируемых регенерантов, шт	Высота регенерантов, см	Минимальная высота регенеранта, см	Максимальная высота регенеранта, см
Brigitta blue	Лампа светодиодная	1	81	1,874±0,027	1,000	2,500
		2	139	1,539±0,039	1,000	3,100
		3	157	1,360±0,023	0,700	3,300
		4	107	1,623±0,026	1,250	2,300
		5	69	1,669±0,042	1,150	3,200
	OSRAM L 36W/76 Natura	1	130	0,952±0,016	0,700	1,550
		2	72	0,923±0,020	0,700	1,300
		3	89	0,924±0,020	0,600	1,500
		4	90	1,003±0,037	0,700	3,200
		5	121	0,734±0,018	0,450	1,700
Bluejay	Лампа светодиодная	1	14	1,186±0,271	0,300	3,200
		2	24	1,292±0,182	0,200	3,200
		3	14	0,993±0,231	0,200	3,000
		4	79	1,727±0,058	0,850	3,300
		5	34	1,488±0,107	1,000	2,850
	OSRAM L 36W/76 Natura	1	12	0,625±0,120	0,200	1,500
		2	29	0,962±0,088	0,200	2,100
		3	27	0,956±0,122	0,100	2,400
		4	4	1,000±0,187	0,500	1,400
		5	22	1,195±0,099	0,550	2,000
HCP ₀₅			–	0,196	–	–
HCP ₀₁			–	0,274	–	–

«←» – отсутствие данных.

Высота регенерантов приводится как «среднее арифметическое ± стандартная ошибка».

В случае Bluejaу максимальная высота регенерантов при освещении светодиодными лампами в четырех случаях из пяти находилась в пределах 30,00–33,00 мм, в то время как у регенерантов, освещаемых люминесцентными лампами не превышала 24,00 мм (табл. 1). В целом высота регенерантов Bluejaу для вариантов опыта со светодиодной и люминесцентной подсветкой варьировала в пределах 2,00–33,00 мм и 1,00–24,00 мм соответственно.

Результаты анализа изменчивости исследуемых признаков приведены в таблице 2. Согласно полученным данным, высота регенерантов под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,01$) превышала высоту регенерантов под люминесцентной на 7,06 мм у сорта Brigitta blue и на 3,89 мм у сорта Bluejaу.

Коэффициенты размножения (по количеству формируемых побегов и по количеству полноценных эксплантов соответственно) у регенерантов Bluejaу под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,05$ и при $P < 0,01$) превышали таковые у регенерантов под люминесцентной лампой в 1,94 и 3,54 раз соответственно (табл. 2). Та же тенденция сохранялась у сорта Brigitta blue. В данном случае, несмотря на превышение в 1,13 и 1,31 раз (соответственно указанным коэффициентам размножения) не удалось выявить достоверности превышения по данным признакам у Brigitta blue. Тем не менее, установленные тенденции и закономерности свидетельствуют о возможности за один и тот же промежуток времени при использовании светодиодных ламп производить большее количество качественного материала и существенно сокращать сроки производства *in vitro* необходимого количества регенерантов для их последующего укоренения и адаптации.

Таблица 2 – Изменчивость количественных признаков (среднее арифметическое ± стандартная ошибка) у регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Сорт	Тип лампы	Высота регенерантов, см	Коэффициент размножения /побеги, шт	Коэффициент размножения/экспланты, шт
Brigitta blue	OSRAM L 36W/76 Natura	0,907±0,046	3,974±0,264	4,526±0,325
	Лампа светодиодная	1,613±0,084**	4,498±0,375	5,918±0,533
HCP ₀₅		0,196	1,239	1,991
HCP ₀₁		0,274	1,738	2,793
Сорт	Тип лампы	Высота регенерантов, см	Коэффициент размножения/побеги, шт.	Коэффициент размножения/экспланты, шт.
Bluejaу	OSRAM L 36W/76 Natura	0,948±0,092	1,430±0,125	1,090±0,315
	Лампа светодиодная	1,337±0,126**	2,780±1,016*	3,860±1,633*
HCP ₀₅		0,196	1,239	1,991
HCP ₀₁		0,274	1,738	2,793

* – различия достоверны при $P < 0,05$.

** – при $P < 0,01$.

Для регенерантов сорта Bluejaу был установлен необычный эффект уменьшения количества полноценных эксплантов по отношению к количеству формируемых *in vitro* побегов при освещении люминесцентными лампами, в то время как при освещении светодиодными лампами соотношение экспланты/побеги по величине было стандартно больше 1 (табл. 3). В целом, отношение экспланты/побеги у регенерантов Bluejaу под люминесцентными лампами по величине варьировало в пределах 0,36–0,82 в четырех случаях из пяти. В работе использовали одинаковые по составу среды для размножения *in vitro* регенерантов двух разных сортов голубики высокой. Указанный эффект, возможно, связан с разной, определяемой генотипом, отзывчивостью растений того или иного сорта на разные условия освещения. Для того чтобы установить достоверность влияния разных факторов на изменчивость трех анализируемых признаков и подтвердить достоверность

влияния генотипа на изменчивость признаков, был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, результаты которого приведены в таблице 4.

Согласно полученным данным, тип лампы оказывал существенное, высоко достоверное (при $P<0,01$) влияние на изменчивость признаков «высота регенерантов» и «коэффициент размножения/экспланты». При этом доля влияния фактора составила 63,5 % и 17,3 % соответственно (табл. 4). Фактор «генотип», как и ожидалось, оказывал существенное, достоверное (при $P<0,01$ и при $P<0,05$ соответственно) влияние на изменчивость признаков «коэффициент размножения/побеги» и «коэффициент размножения/экспланты». При этом доля влияния фактора составила 42,7 % и 30,2 % соответственно. Необходимо отметить достаточно высокий уровень доли влияния неучтенных факторов (случайные отклонения) на изменчивость анализируемых признаков – 20,5 %, 36,5 % и 40,1 % соответственно признакам «высота регенерантов», «коэффициент размножения/побеги» и «коэффициент размножения/экспланты».

Таблица 3 – Изменчивость коэффициента размножения у регенерантов сорта Bluejaу голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Тип лампы	Номер колбы	Коэффициент размножения/побеги, шт	Коэффициент размножения/экспланты, шт	Отношение $KP_{\text{Э}}/KP_{\text{П}}$
Лампа светодиодная	1*	5,64	8,93	1,58
	2*	4,86	6,57	1,35
	3	1,24	1,52	1,23
	4	1,11	1,17	1,05
	5	1,05	1,11	1,06
OSRAM L 36W/76 Natura	1*	1,56	1,28	0,82
	2*	1,76	2,24	1,27
	3	1,45	0,75	0,52
	4	1,00	0,68	0,68
	5	1,38	0,50	0,36

* – отмечены колбы, из которых регенеранты для пассажа были взяты 27 апреля.

$KP_{\text{П}}$ – коэффициент размножения/побеги.

$KP_{\text{Э}}$ – коэффициент размножения/экспланты.

Таблица 4 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Источник варьирования	Степень свободы	Высота регенерантов		Коэффициент размножения/побеги		Коэффициент размножения/экспланты	
		Средние квадраты	Доля влияния, %	Средние квадраты	Доля влияния, %	Средние квадраты	Доля влияния, %
Общее	19	0,124	–	2,796	–	6,571	–
Фактор А (тип лампы)	1	1,500**	63,472	4,390	8,262	21,653*	17,342
Фактор В (генотип)	1	0,069	2,931	22,706**	42,735	37,730*	30,219
АЧВ	1	0,125	5,289	0,853	1,605	2,374	1,901
Повторности	4	0,046	7,856	1,449	10,909	3,258	10,436
Случайные отклонения	12	0,040	20,451	1,616	36,488	4,172	40,102

«–» – отсутствие данных.

* – значимо при $P<0,05$.

** – при $P<0,01$.

В работах отечественных исследователей для регенерантов голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. и брусники садовой *Vaccinium vitis-idaea* L. *in vitro* были установлены эффекты замедления роста, которые носили исключительно сезонный характер [1]. При этом установлено, что наиболее успешным периодом для введения сортов указанных видов в культуру *in vitro* является промежуток времени со второй половины апреля до конца мая. Продолжительность нашего эксперимента, анализ результатов которого приводится в данной статье, охватывала период с марта по июнь. За указанный период было осуществлено по пять пассажей регенерантов каждого сорта (Brigitta blue и Bluejay) голубики высокой *in vitro* под каждым из двух анализируемых типов ламп. Необходимо отметить тот факт, что наиболее высокие значения признаков «коэффициент размножения/побеги» и «коэффициент размножения/экспланты», приведенные в таблице 3, были получены на регенерантах, расчлененных 27 апреля. Для того чтобы установить достоверность и долю влияния сезонности проведения эксперимента на изменчивость коэффициентов размножения у регенерантов голубики высокой *in vitro*, необходимо ввести в дисперсионный анализ соответствующий третий фактор. В нашей работе это не выполнимо, поскольку в фиксированный день содержимое каждой из колб, каждого варианта опыта бралось для пассажа в полном объеме. Тем не менее, результаты исследований подтверждают факт изменчивости анализируемых признаков в зависимости от сезонного времени проведения эксперимента.

Выводы.

При освещении светодиодными лампами высота регенерантов двух исследуемых сортов голубики высокой (Brigitta blue и Bluejay), культивируемых *in vitro*, достоверно (при $P < 0,01$) на 3,57–11,40 мм и на 2,93–11,02 мм соответственно для каждого из приведенных сортов превышала высоту регенерантов, культивируемых *in vitro* при освещении люминесцентными лампами OSRAM L36W/76 Natura.

Максимальная высота регенерантов двух исследуемых сортов голубики высокой при освещении светодиодными лампами превышала соответствующие показатели у регенерантов, освещаемых люминесцентными лампами: для регенерантов сорта Brigitta blue – 33,00 мм и 17,00 мм, в соответствии с используемыми для освещения типами ламп; для регенерантов Bluejay данные показатели составили 33,00 мм и 24,00 мм соответственно.

Анализ изменчивости исследуемых признаков показал, что высота регенерантов под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,01$) превышала высоту регенерантов под люминесцентной лампой на 7,06 мм у сорта Brigitta blue и на 3,89 мм у сорта Bluejay. Оба анализируемых коэффициента размножения у регенерантов Bluejay под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,05$ и при $P < 0,01$) в 1,94 и 3,54 раз превышали таковые у регенерантов под люминесцентной лампой.

Для регенерантов сорта Bluejay установлен эффект уменьшения количества полноценных эксплантов по отношению к количеству формируемых *in vitro* побегов при освещении люминесцентными лампами, в то время как при освещении светодиодными лампами соотношение экспланты/побеги по величине было стандартно больше единицы. Данный эффект, вероятно, связан с различной, определяемой генотипом, реакцией растений разных сортов на разные условия освещения.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил существенное, высоко достоверное (при $P < 0,01$) влияние типа ламп на изменчивость признаков «высота регенерантов» и «коэффициент размножения/экспланты», с долей влияния фактора 63,5 % и 17,3 % соответственно; а также существенное, достоверное (при $P < 0,01$ и при $P < 0,05$ соответственно) влияние генотипа на изменчивость признаков «коэффициент размножения/побеги» и «коэффициент размножения/экспланты», с долей влияния фактора 42,7 % и 30,2 %, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Минск, 1996. – 246 с.
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. Pijut, P.M. Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications / P.M. Pijut, K.E. Woeste, G. Vengadesan, C.H. Michler // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – Vol. 43, Issue 4. – 2007. – P. 283 – 303.

4. Merkle, S.A. Hardwood tree biotechnology / S.A. Merkle, C.J. Nairn // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* – Vol. 41, Issue 5. – 2005. – P. 602 – 619.
5. Maximova, S.N. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis / S.N. Maximova, A. Young, Sh. Pishak, M.J. Guiltinan // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* – Vol. 44, Issue 6. – 2008. – P. 487–493.
6. Pereira, M.J. Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (*Ericaceae*) by micropropagation using seedling nodal explants / M.J. Pereira // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* – Vol. 42, Issue 1. – 2006. – P. 65 – 68.
7. Вечернина, Н.А. Ускоренное размножение голубики топяной *in vitro* / Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, А.А. Эрст, А.Б. Горбунов // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета.* – Т. 44. – № 6. – 2008. – С. 21 – 25.
8. Волотович, А.А. Разработка и внедрение инновационной технологии ускоренного производства посадочного материала растений семейств *Vacciniaceae* и *Ericaceae* на базе УО «Полесский государственный университет»: материалы IV межд. науч.-практ. конференции «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы», Пинск, 20-22 мая 2010 г. / А.А. Волотович [и др.] – Пинск, 2010. – Ч. II. – С. 163 – 165.
9. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова [и др.]. – Минск: Беларус. Наука, 2007. – 442 с.
10. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микроклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // *Плодоводство.* – 2007. – Т. 19. – С. 209 – 216.
11. Тихомиров, А.А. Спектральный состав света и продуктивность растений / А.А. Тихомиров, Г.М. Лисовский, Ф.Я. Сидько. – Нс.: Наука. Сиб. отделение, 1991. – 168 с.
12. Шульгин, И.А. Растение и солнце / И.А. Шульгин. – Л.: Гидрометеиздат, 1973. – 251 с.
13. Юнович, А.Э. Современное состояние и тенденции развития светодиодов и светодиодного освещения / А.Э. Юнович // *Светотехника.* – 2007. – № 6. – С. 13–17.
14. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
15. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 650 с.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF HEIGHT AND REPRODUCTION FACTOR
VARIABILITIES OF VACCINIUM CORYMBOSUM L. SHOOTS
IN VITRO UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF ILLUMINATION**

O.A. KUDRYASHOVA, T.V. GERASIMOVICH, A.A. VOLOTOVICH, T.A. SENKOVETC

Summary

The results of trials of the created pre-production model of a light-emitting diode lamp as well as comparative analysis of efficiency of use of light installations with different type of lamps for growth and development stimulation of shoots of two *Vaccinium corymbosum* L. varieties *in vitro* are presented in this article. Authentic (at $P<0.01$) influence of used lamps type on variability of traits «shoot height» and «reproduction factor by explants» is established. Essential, authentic (at $P<0.01$ and at $P<0.05$ accordingly) influence of genotype on variability of traits «reproduction factor by shoots» and «reproduction factor by explants» is also established.

© Кудряшова О.А., Герасимович Т.В., Волотович А.А., Сенковец Т.А.

Поступила в редакцию 5 октября 2010г.