

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ VACCINIUM CORYMBOSUM L. IN VITRO

А.А. ВОЛОТОВИЧ, О.А. КУДРЯШОВА, А.С. КОХНЮК, Л.С. ЦВИРКО

Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

**Введение.** Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Республики Беларусь, особенно в южной агроклиматической зоне страны [1].

Процесс клонального микроразмножения растений *in vitro* начинается с этапа введения растений в культуру *in vitro* путем изолирования и стерилизации первичного экспланта с последующим его размещением на стерильной, питательной среде для инициации побегообразования *in vitro* [2].

Основным источником энергии для фотосинтетической и биопродукционной активности высших растений является световая энергия естественного (Солнце), либо искусственных источников освещения. Для физиологических процессов в организме растений наибольшее значение имеет коротковолновая радиация, диапазон которой условно подразделяется на ультрафиолетовую ( $\lambda = 0,3 - 0,4$  мкм), видимую ( $\lambda = 0,40 - 0,75$  мкм) и близкую инфракрасную ( $\lambda_{\text{БИКР1}} = 0,75 - 1,20$  мкм;  $\lambda_{\text{БИКР2}} = 1,20 - 4,00$  мкм) области [3].

Область физиологической радиации, поглощаемой пигментами листьев зеленых растений, находится в диапазоне 0,35 – 0,75 мкм и составляет более половины всего излучения Солнца. В пределах физиологической радиации выделяется область фотосинтетически активной радиации (0,38 – 0,71 мкм), имеющая два основных максимума поглощения пигментами листьев зеленых растений в областях 650–670 и 430–480 нм. 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 [3, 4]. Создание новых источников света, для выращивания растений в условиях искусственного освещения усложняется 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, которые открывают неограниченные возможности в области светокультуры растений.

Светодиод (light emitting diode, или LED) – полупроводниковый прибор, преобразующий электрический ток непосредственно в световое излучение практически без потерь и в относительно узкой полосе спектра, ширина которой составляет 20-30 нм [5]. Узкая ширина спектра излучения позволяет использовать светодиоды для формирования светильников со специальным составом спектра, позволяющего активировать фотофизиологические и биопродукционные процессы у растений.

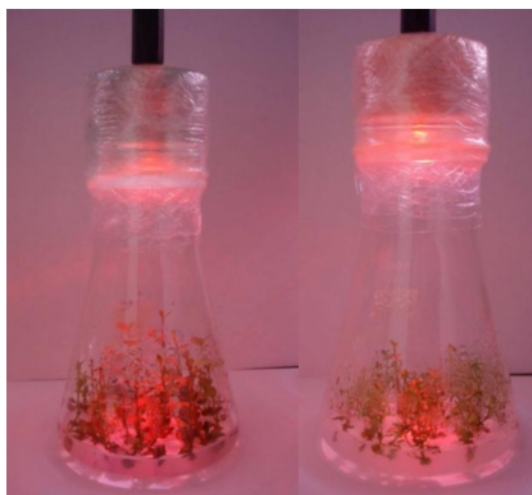
В настоящей статье приведены результаты испытаний созданной нами установки освещения на основе светодиодов, и анализ изменчивости биопродукционных параметров у регенерантов сортов Northland и Brigitta голубики высокой, размножаемых *in vitro*.

**Методика и объекты исследования.** Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» в январе-феврале 2011 года.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сортов Northland и Brigitta голубики высокой *V. corymbosum* L., в количестве не менее 120 регенерантов для каждого варианта опыта (из расчета по 40 регенерантов в колбе), в двукратной повторности. 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 WPM [6], содержащей 5 мг/л 6-( $\gamma,\gamma$ -диметилаллиламино)пурина, 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты, иные органические соединения – трилон Б, тиамин хлорид, пиридоксин хлорид, никотиновую кислоту, глицин, мезо-инозитол, аденин сульфат, сахарозу – и агар-агар.

Учет анализируемых признаков – высота регенерантов, сырой вес регенерантов, коэффициенты размножения (как количество побегов, формируемых из одного экспланта, и как количество эксплантов, каждый из которых представлен двумя метамерами, полученных из сформированного регенеранта), сырой вес побегов регенеранта (без каллюса), содержание хлорофилла a, b и каротиноидов – проводили через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, относительной влажности воздуха 70%.

В качестве источников освещения использовали люминесцентные лампы OSRAM L36W/76 Natura (4 лампы – 6000 лк, потребляемая мощность одной лампы – 36 Вт, CCT = 6200–6500 К), либо оригинальные установки освещения на основе светодиодов, представляющие собой надеваемый на колбу пластиковый колпачок со встроенными с внутренней стороны пятью светодиодами (ARL-5213-UVS-λ400 нм; ARL-3014-UWS-λ400 нм; ARL-λ630 нм). Опытные образцы светодиодной установки освещения, сконструированные сотрудниками НИЛ клеточных технологий в растениеводстве в декабре 2010 года, представлены на рисунке. Освещенность из расчета на один опытный образец (5 светодиодов указанной выше маркировки) – около 20000 лк. Предложенный образец установки освещения на основе светодиодов отличается тем, что предназначен для прямого (без потерь) освещения растительного материала *in vitro*. Для сохранения стерильности содержимого колбы, внутренняя часть колпачка со светодиодами перед применением протирается 70%-ным раствором спирта этилового и выдерживается на протяжении 1 часа под ультрафиолетовыми лампами.



**Рисунок – Опытный образец установки освещения на основе светодиодов в действии, слева регенеранты сорта Northland, справа – сорта Brigitta**

Содержание фотосинтетических пигментов хлорофилла a, b и каротиноидов в мг на г сырого веса определяли при помощи спектрофотометра Cary 50 (Varian, США) по расчетным формулам [7].

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [8], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [9]. 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 [10].

**Результаты и их обсуждение.** В таблице 1 приведены результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у регенерантов сортов Brigitta и Northland голубики высокой *in vitro*. Для каждого анализируемого сорта, по каждому анализируемому признаку выделены значения, достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) превышающие соответствующий наименьший показатель по вариантам опыта.

Анализ изменчивости высоты регенерантов указывает на то, что освещение растительного материала обоих исследуемых сортов светодиодами приводит к достоверному (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) увеличению показателей признака в 1,3 раза, по сравнению с показателями данного признака при люминесцентном освещении (табл. 1).

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у регенерантов сортовой голубики высокой при разных условиях освещения *in vitro*

| Сорт                                  | Источник освещения | КРп         | ВР, см             | КРэ   | СВР, г        | СВб/к, г      | Хл а, мг/г сырого веса | Хл b, мг/г сырого веса | КРН, мг/г сырого веса |
|---------------------------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------|---------------|---------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| Brigitta                              | ЛЛ                 | 5,32±0,43   | 1,20±0,05          | 9,88  | 0,0413±0,0027 | 0,0216±0,0018 | 0,440±0,001            | 0,120±0,005            | 0,210±0,005           |
|                                       | С                  | 5,64±0,48   | <b>1,60±0,99*</b>  | 10,30 | 0,0443±0,0045 | 0,0243±0,0025 | <b>0,720±0,001**</b>   | <b>0,230±0,008**</b>   | <b>0,290±0,006**</b>  |
| Northland                             | ЛЛ                 | 1,68±0,13   | 1,91±0,18          | 3,36  | 0,0673±0,0113 | 0,0452±0,0077 | 0,150±0,001            | 0,040±0,001            | 0,080±0,004           |
|                                       | С                  | 1,76±0,12   | <b>2,37±0,13**</b> | 4,00  | 0,0533±0,0062 | 0,0257±0,0024 | <b>0,380±0,001**</b>   | <b>0,110±0,002**</b>   | <b>0,170±0,004**</b>  |
| НСР <sub>0,05</sub> (по факторам)     |                    | <b>1,27</b> | <b>0,25</b>        | -     | <b>0,0280</b> | <b>0,0234</b> | <b>0,000</b>           | <b>0,001</b>           | <b>0,032</b>          |
| НСР <sub>0,01</sub> (по факторам)     |                    | <b>2,33</b> | <b>0,46</b>        | -     | <b>0,0516</b> | <b>0,0431</b> | <b>0,000</b>           | <b>0,003</b>           | <b>0,059</b>          |
| НСР <sub>0,05</sub> (частные средние) |                    | <b>1,79</b> | <b>0,35</b>        | -     | <b>0,0396</b> | <b>0,0331</b> | <b>0,000</b>           | <b>0,002</b>           | <b>0,045</b>          |
| НСР <sub>0,01</sub> (частные средние) |                    | <b>3,29</b> | <b>0,65</b>        | -     | <b>0,0729</b> | <b>0,0609</b> | <b>0,000</b>           | <b>0,005</b>           | <b>0,083</b>          |

Примечание – Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней; прочерк «-» означает отсутствие данных; \* - значимо при  $P<0,05$ ; \*\* - значимо при  $P<0,01$ ; ЛЛ – лампа люминесцентная OSRAM L 36W/76 Natura; С – светодиоды; ВР – высота регенерантов; КРп – коэффициент размножения, побеги; КРэ – коэффициент размножения, экспланты; СВР – сырой вес регенеранта; СВб/к – сырой вес регенеранта без каллюса; Хл а – хлорофилл а; Хл b – хлорофилл b; КРН – каротиноиды; то же для таблицы 2

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков сортовой голубики высокой при разных условиях освещения *in vitro*

| ИВ                   | df | КРп             |      | ВР             |      | СВР   |      | СВб/к |      | Хл а           |      | Хл b           |      | КРН            |      |
|----------------------|----|-----------------|------|----------------|------|-------|------|-------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
|                      |    | СК              | ДВ,% | СК             | ДВ,% | СК    | ДВ,% | СК    | ДВ,% | СК             | ДВ,% | СК             | ДВ,% | СК             | ДВ,% |
| Общее                | 7  | 4,174           | -    | 0,265          | -    | 0,000 | -    | 0,000 | -    | 0,047          | -    | 0,005          | -    | 0,007          | -    |
| Фактор А             | 1  | <b>28,163**</b> | 96,4 | <b>1,535**</b> | 82,7 | 0,001 | 37,8 | 0,000 | 25,1 | <b>0,198**</b> | 60,0 | <b>0,020**</b> | 52,9 | <b>0,031**</b> | 67,1 |
| Фактор В             | 1  | 0,074           | 0,3  | <b>0,173*</b>  | 9,3  | 0,000 | 3,7  | 0,000 | 11,0 | <b>0,130**</b> | 39,3 | <b>0,016**</b> | 42,8 | <b>0,014**</b> | 31,0 |
| АхВ                  | 1  | 0,025           | 0,1  | 0,024          | 1,3  | 0,000 | 8,9  | 0,000 | 19,3 | <b>0,001**</b> | 0,4  | <b>0,001**</b> | 2,1  | 0,001          | 0,1  |
| Повторности          | 1  | 0,006           | 0,1  | 0,087          | 4,7  | 0,000 | 21,2 | 0,000 | 19,1 | 0,001          | 0,2  | 0,001          | 2,1  | 0,001          | 0,5  |
| Случайные отклонения | 3  | 0,316           | 3,1  | 0,012          | 2,0  | 0,000 | 28,4 | 0,000 | 25,5 | 0,001          | 0,1  | 0,001          | 0,1  | 0,001          | 1,3  |

Примечание – Прочерк «-» означает отсутствие данных; ИВ – источник варьирования; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – сорта голубики высокой (Brigitta, Northland); фактор В – тип освещения (люминесцентное, светодиодное)

Установлена также тенденция к увеличению коэффициентов размножения для каждого из исследуемых сортов при освещении светодиодами. При этом количество эксплантов, полученных из сформированного регенеранта у сорта Northland, в 1,2 раза превышало таковое под люминесцентными лампами (табл. 1).

Анализ изменчивости показателей сырого веса у регенерантов не выявил достоверных различий между вариантами опыта. Тем не менее, следует отметить, что в случае сорта Brigitta под светодиодами формировались регенеранты с большей массой (как с каллюсом, так и без него), в то время как в случае сорта Northland регенеранты с большей массой формировались под люминесцентными лампами (табл. 1).

Наиболее существенные, высоко достоверные при  $P < 0,01$  различия между вариантами опыта были установлены по содержанию фотосинтетических пигментов – хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов (табл. 1). Следует отметить, что во всех исследуемых случаях содержание фотосинтетических пигментов у регенерантов, сформированных под светодиодами существенно (для сорта Northland – более чем в 2 раза) превышало таковое у регенерантов под люминесцентными лампами. Так, у сортов Brigitta и Northland превышение по содержанию хлорофилла а составило – 1,64 и 2,53 раза, соответственно; хлорофилла b – в 1,92 и 2,75 раза; каротиноидов – в 1,38 и 2,13 раза, соответственно.

В таблице 2 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа изменчивости анализируемых признаков.

Установлено, что фактор «сорт» оказывает высоко достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние на изменчивость всех исследуемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов, при доле влияния 52,9–96,4 %. Тип освещения (источник света – люминесцентная лампа, либо светодиоды), как фактор, оказывал достоверное влияние на изменчивость высоты регенерантов и содержания фотосинтетических пигментов. Комбинация двух исследуемых факторов оказывала достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние только на изменчивость содержания хлорофиллов а и b (табл. 2).

**Выводы.** Высота регенерантов обоих исследуемых сортов под светодиодами была достоверно (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) в 1,3 раза выше, по сравнению с высотой регенерантов под люминесцентными лампами.

Установлена тенденция к увеличению коэффициентов размножения для каждого из исследуемых сортов, при освещении регенерантов *in vitro* оригинальной установкой освещения на основе светодиодов.

Анализ изменчивости показателей сырого веса у регенерантов не выявил достоверных различий между вариантами опыта. При этом масса регенерантов сорта Brigitta под светодиодами была выше, а сорта Northland – ниже, по сравнению с массой регенерантов, формируемых при люминесцентном освещении.

У регенерантов исследуемых сортов (Brigitta и Northland) под светодиодами *in vitro* наблюдалось достоверное при  $P < 0,01$  превышение по содержанию хлорофиллаа – в 1,64 и 2,53 раза; хлорофилла b – в 1,92 и 2,75 раза; каротиноидов – в 1,38 и 2,13 раза соответственно.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил высоко достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние фактора «сорт голубики высокой» на изменчивость всех исследуемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов, и фактора «тип освещения» – на изменчивость содержания фотосинтетических пигментов.

Сконструированный и испытанный на базе НИЛ КТР ПолесГУ образец установки освещения на основе светодиодов предлагается для регистрации в качестве полезной модели в Национальном центре интеллектуальной собственности Республики Беларусь.

Авторы выражают благодарность начальнику конструкторского отдела ОАО Пеленг» Кудряшову Александру Алексеевичу за научную идею и помощь в реализации проекта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова. – Минск : Беларус. наука, 2007. – 442 с.
2. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Минск, 1996. – 246 с.
3. Шульгин, И.А. Растение и солнце / И.А. Шульгин. – Л.: Гидрометиздат, 1973. – 251 с.

4. 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.
5. Юнович, А.Э. Современное состояние и тенденции развития светодиодов и светодиодного освещения / А.Э. Юнович // Светотехника. – 2007. – №6. – С.13 – 17.
6. 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.
7. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова. – М.: Академа, 2003. – 256 с.
8. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
9. Боровиков, В.П. STATISTICA : Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб : Питер, 2001. – 688 с.
10. 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 REGENERANTS OF HIGH-BUSH BLUEBERRY VARIETIES  
IN VITRO UNDER DIFFERENT MODE OF LIGHTING**

***A.A. VOLOTOVICH, O.A. KUDRYASHOVA, A.S. KAKHNIUK, L.S. TSVIRKO***

***Summary***

There are presented the results of comparative analysis of variability of eight bio-production parameters *in vitro* at Brigitta and Northland high-bush blueberry regenerates under conditions of illumination by luminescent lamps and original device, based on light-emitting diodes. It were observed excess by chlorophyll 'a' maintenance in 1.64 and 2.53 times; by chlorophyll b maintenance – in 1.92 and 2.75 times; by carotenoids – in 1.38 and 2.13 times, accordingly to varieties investigated. The tendency to increase in reproduction factors for each of analyzed varieties is established.

© Волотович А.А., Кудряшова О.А., Кохнюк А.С., Цвирко Л.С.

*Поступила в редакцию 14 октября 2011г.*