

УДК 635.21:581.143.5:631.526.32

АНАЛИЗ СОРТОВЫХ РАЗЛИЧИЙ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕТОДИОДНЫХ СВЕТИЛЬНИКОВ

Т. В. НИКОНОВИЧ, Т. В. КАРДИС

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: TVNIKONOVICH@GMAIL.COM

А. В. КИЛЬЧЕВСКИЙ

Президиум НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь, 220108

В. Л. ФИЛИПЕНЯ, О. В. ЧИЖИК

Лаборатория клеточной биотехнологии Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь, 220012

Ю. В. ТРОФИМОВ, В. И. ЦВИРКО, Е. В. КЕРНОЖИЦКИЙ

РНПУП «Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220090

(Поступила в редакцию 25.01.2018)

*Картофель является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Получение высоких и стабильных урожаев невозможно без качественного посадочного материала. В настоящее время для размножения оздоровленных растений картофеля на начальных этапах семеноводства широко применяются биотехнологические методы. Этап размножения пробирочных растений требует значительных затрат высококвалифицированного труда и электроэнергии. Актуальным является вопрос оптимизации и повышения эффективности производства растений картофеля *in vitro*. В условиях энергосбережения все большую популярность приобретают светодиодные источники освещения, использование которых позволяет оптимизировать процесс выращивания из-за снижения расходов на электроэнергию, возможности регулировать спектральный состав света и значительно более долгого срока службы светодиодов по сравнению с люминесцентными лампами.*

В нашей работе использовались 12 вариантов светильников с различным соотношением спектров R/B (красный/синий). Исследовалось влияние спектра освещения на морфологические признаки картофеля сортов разных групп спелости; были определены признаки, на которые изменение качественного состава света оказывает значительное влияние. Также был выявлен оптимальный вариант освещения, при котором значения признаков являются наибольшими, а сортовые различия наименьшими.

Ключевые слова: картофель, культура *in vitro*, световой спектр, фитолампы, морфогенез, коэффициент размножения.

*Potato is one of the most important crops. Obtaining high and stable yields is impossible without quality planting material. At present, biotechnological methods are widely used for the reproduction of healthy potato plants at the initial stages of seed production. The stage of reproduction of test tube plants requires considerable expenditures of highly skilled labor and electricity. The issue of optimizing and increasing the efficiency of potato plant production *in vitro* is topical. In conditions of energy saving, LED lighting sources are gaining popularity, the use of which allows optimizing the growing process due to lower energy costs, the ability to regulate the spectral composition of light and a significantly longer life of LEDs compared to fluorescent lamps.*

In our work we used 12 variants of lamps with different ratios of R / B spectra (red / blue). The influence of illumination spectrum on the morphological characteristics of potato varieties of different ripeness groups was studied; the signs on which the change in the qualitative composition of light have a significant effect have been determined. Also, the optimal lighting option was identified, in which the values of the signs are greatest, and the varietal differences are the least.

Key words: potato, *in vitro* culture, light spectrum, phyto-lamps, morphogenesis, multiplication factor.

Введение

Для получения стабильно высоких урожаев картофеля важно использовать оздоровленный посадочный материал. Начальный этап современной системы семеноводства базируется на биотехнологических методах, основным из которых является получение из апикальных меристем свободных от инфекции растений и их размножение *in vitro*. Этот этап требует значительных затрат высококвалифицированного труда и электроэнергии. Десятки и сотни тысяч растений-регенерантов картофеля выращиваются при 16-часовом искусственном освещении, оптимальной температуре и влажности воздуха. Таким образом, вопрос о повышении эффективности процесса производства растений картофеля *in vitro* с целью снижения себестоимости семенного материала приобретает особую актуальность.

Размножение растений в условиях *in vitro* зависит от влияния различных внешних и внутренних факторов. К внутренним относятся: генетические, гормональные, физиологические. К внешним: физические (температура, свет, фотопериод, влажность, аэрация) и химические или состав искусственной питательной среды. На размножение в пробирочной культуре также оказывают влияние возраст материнского растения, сезон введения в культуру *in vitro*, величина и качество первичного экспланта [8]. Главная задача при производстве оздоровленных растений картофеля – это увеличение коэффициента размножения и скорости отрастания после черенкования, поэтому необходимость оптимизации условий выращивания *in vitro* стоит достаточно остро [6].

Одним из наиболее значимых факторов роста и развития растений при их выращивании в лаборатории является освещение. В условиях повышения роли энергосбережения в различных сферах деятельности человека все большую популярность приобретают светодиодные источники освещения. Светодиоды обладают определенными преимуществами по сравнению с традиционными источниками освещения и могут излучать свет любой длины волны, в том числе физиологически активной радиации (ФАР), необходимой для функционирования растительного организма. При этом узкий диапазон длин волн светодиодов позволяет конструировать источники освещения с любым соотношением разных областей спектра. Фитоактивная часть спектра подбирается непосредственно под культивируемое растение, что дает преимущество в отсутствии излишнего теплового и ультрафиолетового излучения, исключается риск ожогов и обезвоживания. Использование светодиодных светильников позволит оптимизировать процесс выращивания меристемных растений картофеля за счет снижения расходов на электроэнергию и существенно более долгого срока службы светодиодов в сравнении с люминесцентными лампами [1–5, 7].

Целью нашего исследования являлось выявление сортовых различий у растений-регенерантов картофеля в культуре *in vitro* под влиянием спектрального состава света, определение изменчивых и стабильных признаков, а также выбор оптимального типа светильника для применения при микрклональном размножении в контролируемых условиях.

Основная часть

Работа проводилась на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиоэкологии БГСХА. Объектами исследования выступали три белорусских сорта картофеля: раннеспелый Лилея, среднеранний Архидея и среднеспелый Скарб.

Черенки помещались по одному в пробирки для культивирования с искусственной питательной средой Мурасиге-Скуга. Выращивание проводилось в культуральном помещении, где установлен автоматический температурный режим +24–26 °С, влажность воздуха 70–80 %, длина светового дня 16 часов. Источниками света являлись светодиодные светильники, в которых отношение ППФ (плотность потока фотонов в диапазоне 400–700 нм) оранжево-красно полосы (607–694 нм) к ППФ синей полосы (400–495 нм) варьировалось от 1 до 20. При этом доля ППФ в диапазоне 580–607 нм (желтый) варьировалась от 13 до 22 %, а доля фотонов в диапазоне 495–580 нм (зеленый) – от 18 до 38 %. Всего 12 вариантов освещения. В качестве контроля использовались люминесцентные лампы с ППФ – $38,2 \pm 13,4$ мкмоль / (м²·с).

Состояние растений-регенерантов оценивалось через 21 день после черенкования по следующим признакам: высота растения (мм), количество листьев (шт.), площадь листовой пластинки (мм²), длина корней (см), количество корней (шт.), индекс формирования растения-регенеранта, который определяли отношением высоты растения к длине корней. Нормальным считалось растение, когда индекс формирования растения-регенеранта был равен единице.

Анализ фотосинтетической активности в процессе выращивания растений-регенерантов тестируемых сортов картофеля в разных условиях освещения проводили с использованием переносного импульсного флуориметра ПАМ-2100 (Heinz Walz GmbH), руководствуясь инструкцией производителя и публикациями [9,10]. Для оценки состояния фотосинтетического аппарата определяли значение показателей Fv/Fm (максимально возможный для испытуемых растений квантовый выход фотосистемы II (ФС II)) и Y (реальный квантовый выход ФС II у испытуемых растений).

Таблица 1. Параметры, определяемые с помощью метода индуцированной флуоресценции хлорофилла

Параметр	Физиологический смысл	Формула
Максимальный (потенциальный) квантовый выход фотохимии ФС II (Fv /Fm)	Величина квантового выхода всех комплексов ФС II в растении, отражает количество активных комплексов, способных улавливать кванты света	$Fv /Fm = (Fm - Fo) /Fm$

Реальный квантовый выход (Y)	Доля световой энергии, используемой активными комплексами ФС II в процессе электронного транспорта. Чем больше значение реального квантового выхода, тем больший процент энергии улавливается растениями для фотосинтеза	$Y = (Fm' - Ft') / Fm'$
------------------------------	--	-------------------------

Все аналитические определения выполнялись в 3-кратной биологической повторности. Данные статистически обрабатывались с использованием программы Excel.

По всем изучаемым признакам различия по вариантам освещения достоверны. Полученные данные приведены в таблице. В отдельных вариантах сортовые различия незначительны, в других – превышают различия между вариантами. Так, по высоте растений (рис.1) наибольшие сортовые различия проявлялись в вариантах освещения 7, 8 и 10 (64,7–86,6 мм). Самые стабильные и низкорослые растения-регенеранты сорта Скарб. Их высота менялась в пределах 63,3–101,7 мм. Максимальное значение признака – у Лилеи (81,7–153,3 мм).

Таблица 2. Влияние типов осветителей на развитие растений-регенерантов картофеля в условиях *in vitro*

Сорт	Вариант	Высота, мм	Количество листьев, шт.	Площадь листовой пластинки, мм ²	Длина корней, мм	Количество корней, шт.	Индекс формирования растения-регенеранта
Архидея	1 (контроль)	120,3	9,0	71,6	53,7	11,3	2,2
Лилея		85,8	6,3	53,8	51,5	4,5	1,7
Скарб		64,3	6,7	46,7	24,7	5,3	2,6
Архидея	2	127,0	8,0	40,3	49,3	10,0	2,6
Лилея		138,3	7,7	43,3	46,3	5,0	3,0
Скарб		101,7	7,3	85	76,7	8,3	1,3
Архидея	3	128,3	6,3	55	61,7	11	2,1
Лилея		148,3	10	80	53,3	6,7	2,8
Скарб		86,7	7,7	63,3	53,3	6	1,6
Архидея	4	106,7	7,3	68,3	73,3	4,3	1,5
Лилея		81,7	6,3	51,7	63,3	5	1,3
Скарб		63,3	7,3	108,3	63,3	6,7	1,0
Архидея	5	130,0	6,3	58,3	56,7	5,7	2,3
Лилея		98,3	5,7	31,7	40,0	2	2,5
Скарб		80,0	6	63,3	60,0	5	1,3
Архидея	6	120,0	7	50	65,0	5,3	1,9
Лилея		130,0	7,7	60	66,7	8,7	2,0
Скарб		73,3	5,7	63,3	53,3	5,7	1,4
Архидея	7	136,7	6,7	70	71,7	9,7	1,9
Лилея		106,7	8,3	30	41,7	4,3	2,6
Скарб		65,0	6,7	71	55,0	10	1,2
Архидея	8	133,3	12,3	50	56,7	7,7	2,4
Лилея		153,3	8,7	60	55,0	6,3	2,4
Скарб		66,7	7	85	78,3	6,7	0,9
Архидея	9	116,7	8	96,7	68,3	10,7	1,7
Лилея		91,7	7,7	75	53,3	5,3	1,7
Скарб		65,0	8,3	80	53,3	8,7	1,2
Архидея	10	131,7	9,7	76,7	68,3	9,3	1,9
Лилея		130,0	7	50	50,0	6,7	2,6
Скарб		67,0	7,4	67	101,0	5,6	0,7
Архидея	11	131,7	11	55	66,7	8,3	2,0
Лилея		121,7	7,7	40	56,7	6,3	2,2
Скарб		91,7	8	45	66,7	6,7	1,4
Архидея	12	121,7	8,3	43,3	38,3	12	3,2
Лилея		136,7	7,3	21,7	28,3	3,3	4,8
Скарб		85,0	6,7	35	55,0	5,3	1,6

<i>НСП светильники</i>	3,32	0,37	2,30	2,06	0,36	
<i>НСП сорт</i>	7,77	0,88	5,39	4,84	0,86	

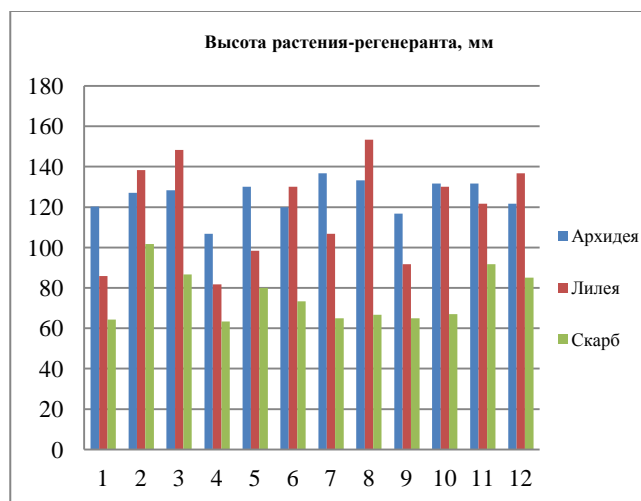


Рис. 1а. Высота растения-регенеранта картофеля при использовании различных типов светодиодных светильников

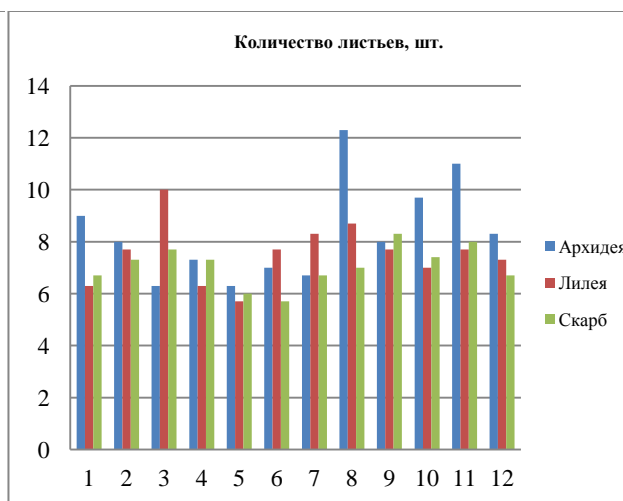


Рис. 1б. Количество листьев у растений-регенерантов картофеля при использовании различных типов светодиодных светильников

Светильник 4 обеспечивал минимальное значение признака всех трех сортов и наименьшую разницу между ними. Противоположный эффект выявлен у растений при 8 варианте освещения: наибольшая разница показателей по сортам и максимальное значение признака у раннего и среднераннего сортов.

Большой интерес представляет признак количество листьев на растении. Этот признак тесно коррелирует с коэффициентом размножения растений-регенерантов, поскольку при черенковании количество новых растений напрямую зависит от числа междоузлий на материнском растении. Результаты исследований представлены на рисунке 1б. При 5 варианте освещения показатели признака наименьшие и разница между сортами незначительна. При использовании фитоламп вариантов 8 и 11 количество листьев на опытных растениях картофеля было наибольшим. Относительно сортовых различий выявлено, что максимальная разница по количеству листьев у растений-регенерантов проявилась при вариантах освещения 1, 3, 8 и 11, минимальная – при вариантах 2, 4 и 5. Самую значительную зависимость данного признака от типа освещения проявили растения сорта Архидея – от 6,3 до 12,3 листа. Выявлена большая разница по площади типичной листовой пластинки, как между сортами, так и по вариантам опыта (рис.2). Примечательно то, что данный признак у среднеспелого Скарба, в отличие от высоты растений и количества листьев, в половине вариантов превышает показатели раннеспелой Лилеи и среднеранней Архидеи. Из применяемых в эксперименте типов светильников, интерес представляет фитолампа 9, которая обеспечивает стабильно высокий показатель у всех трех сортов (от 75 у Лилеи до 96,7 мм² у Архидеи).

Оценка состояния корневой системы исследуемых трех сортов представлена на рисунках 2б и 3а. Длина корней растений картофеля в зависимости от типа применяемой фитолампы изменялась от 24,7 до 101 мм, то есть в четыре раза. Причем предельные значения признака отмечались у растений-регенерантов одного сорта – среднеспелого Скарба. Растения двух других сортов реагируют на смену типов светильников в меньшей степени: раннеспелая Лилея – от 28,3 до 66,7 мм, среднеранняя Архидея – от 55,0 до 66,7 мм. Сочетание высокого показателя признака и наименьших сортовых отличий были отмечены в вариантах освещения 4 и 11. По количеству корней у растений-регенерантов выявлено следующее: лидером выступал сорт Архидея – в восьми вариантах из двенадцати этот показатель превышал 8 корней на растение. Значение признака изменялось от 4,3 до 12 корней на растение. Наименьшее количество корней (2 шт.) растения сорта Лилея сформировали под фитолампой 5, наибольшее (8,7 шт.) – под фитолампой 6. Самые высокие и, вместе с тем, выровненные по сортам показатели данного признака, были выявлены при использовании светильников 8 и 11.

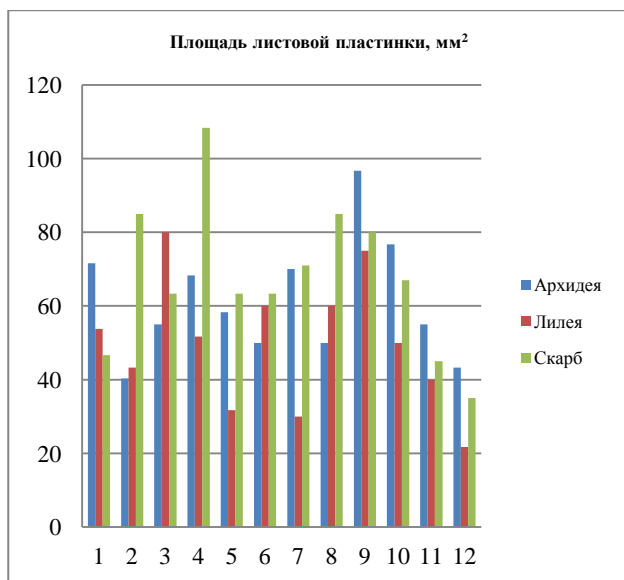


Рис. 2а. Площадь листовой пластинки у растений-регенерантов картофеля при использовании различных типов светодиодных светильников

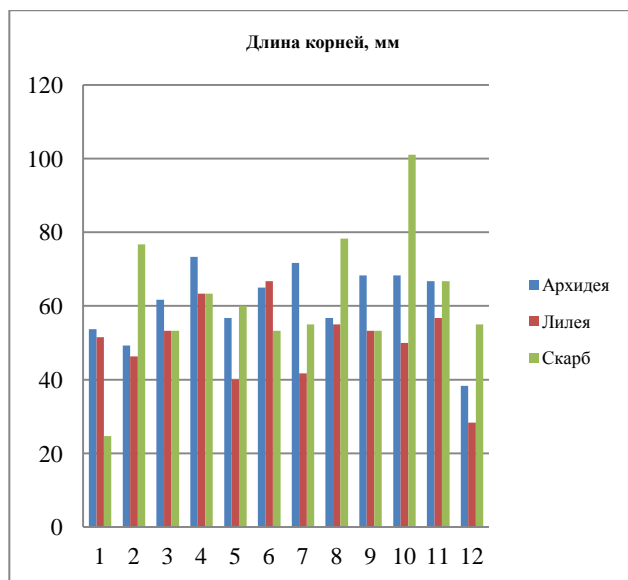


Рис. 2б. Длина корней растений картофеля при использовании различных типов светодиодных светильников

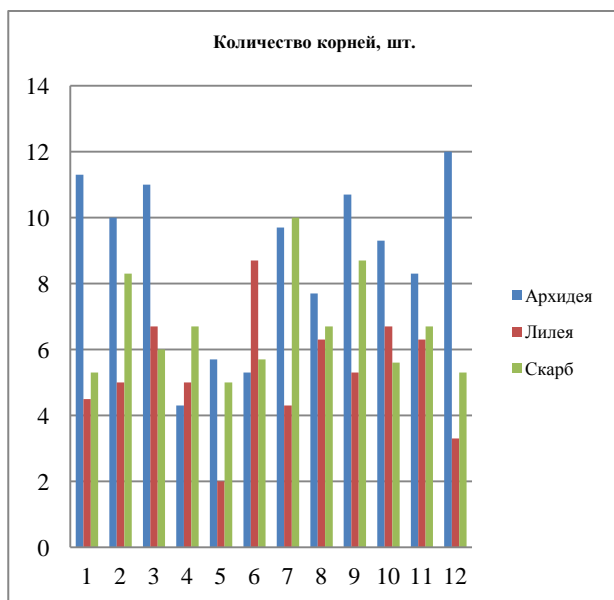


Рис. 3а. Количество корней у растений-регенерантов картофеля при использовании различных типов светодиодных светильников

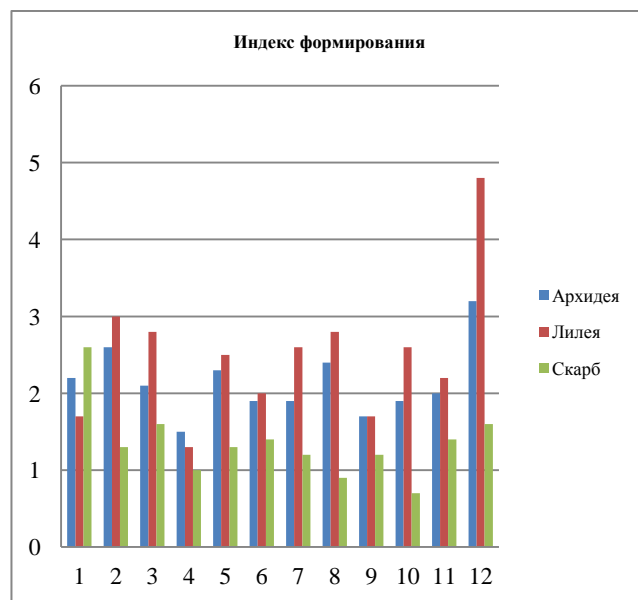


Рис. 3б. Индекс формирования растения-регенеранта (отношение высоты растения к длине корней) при использовании различных типов светодиодных светильников

На рисунке 3б представлены результаты, показывающие изменения индекса формирования растения-регенеранта в зависимости от типа применяемого светильника. Традиционно считается оптимальным соотношение высоты растения к длине корней, равное единице.

Выявлен вариант освещения 12, при котором индексы формирования растения-регенеранта были максимальными. Так, у раннеспелого сорта Лилея индекс формирования растения-регенеранта равен 4,8, у среднераннего сорта Архидея – 3,2. Индекс формирования формирования растения-регенеранта у среднеспелого сорта Скарб был наиболее близок к оптимальному соотношению среди исследуемого набора сортов и составил 1,6. Самыми оптимальными светильниками по данному признаку определены варианты 4 и 9, при которых обеспечивалось формирование растений с наилучшим соотношением надземной части и корней.

Следовательно, светильник 9 отличался тем, что при минимальных сортовых различиях внутри одного варианта он обеспечивал наибольшие средние значения сразу по нескольким признакам: количество листьев – это признак, тесно связанный с коэффициентом размножения; площадь листовой пластинки и индекс формирования растения-регенеранта.

Одной из важнейших характеристик физиологического состояния и жизненного потенциала растения является оценка функционирования его фотосинтетического аппарата. Измерение флуоресценции хлорофилла позволяет исследовать процесс протекания фотохимических реакций в жи-

вых растительных объектах и быстро оценить влияние условий выращивания на изменение клеточного метаболизма [10].

В ходе проведенных исследований установлена зависимость активности световых реакций фотосинтеза у растений картофеля от спектрального состава и типа используемого излучателя. Функциональная активность фотосинтетического аппарата определялась по значениям показателей F_v/F_m (максимальный) и Y (эффективный) фотохимический квантовый выход ФСП.

У исследуемых растений картофеля интенсивность флуоресценции хлорофилла изменялась в значительных пределах (от 0,138 до 0,733). Наиболее высокие значения показателя Y были получены при использовании фитоламп вариантов 4 и 5 (0,733 и 0,710, соответственно), что достоверно выше по сравнению с контрольным вариантом освещения (0,598). Наименьшая активность фотосинтетического аппарата растений картофеля отмечена при освещении светодиодными светильниками вариантов 3 и 2 (0,138 и 0,297, соответственно). Значение показателя эффективный фотохимический квантовый выход ФСП на уровне контрольного варианта зафиксировано при выращивании под фитолампами вариантов 9 и 11 (0,561 и 0,643, соответственно). При использовании фитоламп остальных вариантов значение Y было достоверно ниже контроля и варьировало в пределах от 0,407 до 0,505. Измерение значений показателя максимальный квантовый выход ФСП у растений картофеля, выращиваемых в разных условиях освещения, выявило такую же закономерность.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии спектрального состава и типа используемого излучателя на функциональные характеристики фотосинтетического аппарата при размножении растений картофеля в культуре *in vitro*. Использование фитоламп вариантов 4 и 5 оказало наибольший положительный эффект на протекание фотохимических процессов у исследуемых растений. Высокой эффективностью основного фотосинтетического запаса энергии и, следовательно, функционирования фотосинтетического аппарата характеризуются также растения, выращенные при контрольном освещении и под фитолампами вариантов 9 и 11.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы. Тип светильника оказывал достоверное значимое влияние на проявление морфологических признаков растений-регенерантов картофеля в культуре *in vitro*. Сортовые различия также достоверны.

Признаки, в наибольшей мере реагирующие на спектральный состав фитоламп, – площадь листовой пластинки, индекс формообразования растения-регенеранта и эффективный фотохимический квантовый выход ФСП. Относительно стабилен признак высота растения-регенеранта.

Оптимальным типом светильника для применения при микроклональном размножении картофеля из исследуемых нами являлся светильник 9 со спектральным соотношением красный/синий 1,3 и уровнем потока фотонов не менее 70,1 мкмоль/с, поскольку он обеспечивал наибольшие средние значения признаков в сочетании с минимальными сортовыми различиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахарев, И. Применение светодиодных светильников для освещения теплиц: реальность и перспектива / И. Бахарев, А. Прокофьев, А. Туркин, А. Яковлев / Современные технологии автоматизации. – 2010. – № 2. – С. 76–82.
2. Изучение влияния различных видов освещения на рост и развитие меристемных растений картофеля *in vitro* / А. В. Милехин [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. №4(3). – С. 57–580.
3. Моисеева, М. О. Оценка состояния растений-регенерантов лилии Мартагон, полученных при различном светодиодном освещении / М. О. Моисеева, Т. В. Никонович, В. И. Цвирко // Лесная наука, молодежь, будущее. Материалы международной школы-конференции молодых ученых. – Гомель, 2017. – С. 202–206.
4. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на процесс регенерации лилии Мартагон в культуре *in vitro*. / Т. В. Никонович, М. О. Моисеева, М. Ю. Шпак // Сборник научных работ «Плодоводство и ягодоводство России». Том XXXIII. – 2012. – С. 387–395.
5. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vitro* / Т. В. Никонович, А. В. Левый, В. В. Французенок // Вестник БГСХА. – 2012. – № 2. – С. 70–75.
6. Смолеговец, Д. В. Инновации в системе клонального микроразмножения картофеля и выращивания биотехнологических микроклубней / Д. В. Смолеговец, Б. В. Анисимов // Картофелеводство (результаты исследований, инновации, практический опыт). – Т. 1. – М., 2013. – С. 304–310.
7. Тихомиров, А. А. Светокультура растений в теплицах / А. А. Тихомиров, В. П. Шарупич, Г. М. Лисовский // Издательство СО РАН. – Новосибирск, 2013. – 205 с.
8. Фёдорова Ю. Н. Влияние света разного спектрального состава на рост растений картофеля *in vitro* / Ю. Н. Фёдорова, Н. В. Лебедева // Известия Великолукской ГСХА. 2016. – №4. – С. 2–7.
9. Яцко, Я. Н. Пигментный аппарат вечнозеленых растений на севере: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. б. н. / Я. Н. Яков. – СПб., 2010. – 21 с.
10. Рубин, А. Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга / А. Б. Рубин // Технология живых систем, 2005. – Т. 2. – С. 47–68.