

ОПТИМІЗАЦІЯ АДАПТАЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ ДО УМОВ *IN VIVO*

О. О. ОЛІЙНИК, М. Д. МЕЛЬНИЧУК

Національний університет біоресурсів та природокористування України
Факультет захисту рослин, біотехнології та екології
Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття
e-mail: osa_solodar@ukr.net

Підібрано оптимальні умови та тип субстрату для ефективної адаптації клонів троянди ефіроолійної сорту Лань до умов in vivo. Встановлено, що найкращим способом адаптації та дорожчування рослин перед закладанням плантацій є адаптація в умовах теплиці за використання суміші торф:перліт (2:1), що сприяє швидкій приживлюваності клонів. Оптимальними для перенесення в умови in vivo є регенеранти висотою не менше ніж 3,5см. Найвдалішим періодом перенесення рослин з умов in vitro до умов in vivo є кінець травня – початок червня, а з умов in vivo до ex vitro є кінець липня – початок серпня. Електромагнітні спектри абсорбції енергії пластидними пігментами показують, що рослини троянди ефіроолійної в умовах відкритого ґрунту у 2,0-2,3 рази збільшують здатність поглинати світло. Основні максимуми поглинання електромагнітної енергії не змінюються. Кількісні співвідношення хлорофілів в адаптаційний період пропорційно збільшується. При перенесенні рослин, після первинної адаптації, в умови дрібноділяночного дослідження сума хлорофілів зменшувалась. У відповідь на нові умови зростання у листках рослин активізувався синтез захисної групи пігментів, що відповідно викликало зниження показника співвідношення суми хлорофілів до каротиноїдів. На фоні зменшення вмісту хлорофілів у листках в процесі адаптації рослин в умовах відкритого ґрунту, лінійне зростання у листках загальної кількості фенольних сполук і фенольних антиоксидантів свідчить про мобільність системи їх синтезу. Кількість загальних фенолів за весь період адаптації збільшився у 6, а катехинів і фенольних антиоксидантів у 7 разів. У даному аспекті доречним виглядає використання ванілінової кислоти у якості активатора фенілпропановидного синтезу, для прискорення процесів накопичення захисних метаболітів. Таким чином, контроль стану рослин-регенерантів у процесі їх адаптації за біохімічними маркерами дозволяє оптимізувати режим дорожчування рослин з урахуванням їх сортоспецифічних властивостей. Розробка референтних методів контролю стану рослин за пігментним складом, кількісними і якісними показниками продуктів вторинного метаболізму із застосуванням методів вимірювання флуоресценції хлорофілів дозволяє створювати системи сортоадаптації.

Ключові слова: адаптація, субстрат, in vivo, троянда ефіроолійна

Вступ. На завершальних етапах отримання оздоровленого садивного матеріалу рослини-регенеранти поступово переводять з асептичних умов, де вони перебувають у частково ізолюваному просторі до закритого ґрунту, де рослини піддаються новим факторам впливу. Одним з головних лімітуючих факторів для рослин-регенерантів є вологість повітря і режим освітлення (Дедюхіна, 2011). За відсутністю в умовах штучного освітлення УФ променів рослини не напрацьовують у достатній кількості захисних пігментів і спеціальних структур (антоціани, флавоноїди, матеріали для формування кутикули необхідної товщини) (Волинець, 2013). Існує ще декілька факторів, які необхідно враховувати при перенесенні рослин-регенерантів у ґрунт: висота рослини, спосіб перенесення, терміни висадки, довжина коренів, субстрат (Зарубина та ін., 1988). Відомо, що для адаптації рослин-регенерантів родини *Rosa L.* найбільш поширеним є ступінчастий спосіб,

який складається з адаптації до умов закритого ґрунту та адаптації до умов відкритого ґрунту (Лемпівський, 1958). При цьому для адаптації рослин-регенерантів до умов закритого ґрунту важливе значення має забезпечення відповідних рівнів живлення рослин. Мета дослідження – підібрати оптимальні умови й субстрат для адаптації та дослідити стан фотосинтетичного апарату клонів троянди ефіроолійної сорту Лань у після адаптаційний період.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень слугував сорт троянди ефіроолійної Лань української селекції. До умов *in vivo* адаптовували рослини – регенеранти з оптимально сформованою кореневою системою та вегетативною масою. Дослідження проводили в умовах адаптаційної кімнати навчально-наукової лабораторії фітовірусології та біотехнології за температури 22-25°C, відносної вологості повітря 70-75%, освітленості 2,0-3,0лк і 16-годинним фотоперіодом, в теплиці

НДЛ «Плодоовочевий сад» і на розсаднику Ботанічного саду НУБіП України. Рослинний матеріал відбирали на 10 добу на кожному етапі адаптації, загальний вміст фенольних сполук в якому визначали спектрофотометричним методом (Починок, 1976), використовуючи реактив Фоліна – Чокольтеу. Калібрувальний графік будували по галовій кислоті.

Результати та їх обговорення. У процесі отримання садивного матеріалу для створення експериментальної ділянки використовували два способи адаптації рослин до умов *in vivo*, а саме ступеневу в умовах адаптаційної кімнати та дорощування в умовах теплиці. У процесі досліджень визначали найпридатніший субстрат для кожного способу адаптації та оптимальну висоту регенерантів, необхідну для успішної адаптації до умов *in vivo*. Рослини троянди розділяли на дві категорії: перша заввишки 1,5-2,5см та друга – 3,5-4,5см. Виявилось, що оптимальними для перенесення в умови *in vivo* є рослини висотою не менше ніж 3,5см, тобто другої категорії. На 5 добу на них формувались нові листки, а рослини першої категорії гинули. При цьому середній приріст адаптованих рослин на 7 добу для другої категорії становив 1,0-1,5см.

Нами використано три варіанти субстратів: 1 – кокосовий субстрат без домішок; 2 – кокосовий субстрат: перліт (1:1); 3 – торф : перліт (2:1). Протягом першого тижня адаптації регенеранти підживлювали розчином половинної концентрації мінеральних солей за прописом живильного середовища Мурасіге-Скуга (МС) (Кушнір та ін, 2006). Приживлюваність рослин на торф'яній суміші (варіант 3) в перший тиждень (при утримуванні рослин в умовах адаптаційної кімнати) досягала 76%. На другий тиждень адаптації частка життєздатних рослин становила 70%. На кокосовому субстраті без домішок (1 варіант) даний показник на другий тиждень культивування становив 62%, а на кокосовому субстраті з перлітом (2 варіант) – 60%. Необхідно відмітити, що через втрату вологи протягом перших трьох діб відбувається загибель до 10% рослин. Даний процес, перш за все, пов'язаний з механічним пошкодженням кореневих волосків при відмиванні коренів від залишків живильного середовища, завдяки чому знижувалась інтенсивність всмоктування води.

За умов дорощування рослин в умовах теплиці регенеранти характеризувались високою адаптаційною здатністю до умов живлення.

Незначна втрата тургору була помітна лише в першу добу адаптації. Адаптацію регенерантів проводили у теплиці за температури 22-25 °С за умов підвищеної вологості (95-98 %) за рахунок дрібнодисперсного дощування. Перед висаджуванням та наступні два тижні регенеранти підживлювали розчином $\frac{1}{2}$ концентрації мінеральних солей за прописом живильного середовища МС. На другий тиждень адаптації частка життєздатних рослин на субстраті торф:перліт (2:1) становила 92%, на кокосовому субстраті без домішок 90%, на суміші кокосовий субстрат:перліт (1:1) – 88%. Близько 5% рослин гинули в першу добу адаптації через втрату вологи. Даний процес, як і при ступеневій адаптації, перш за все, пов'язаний з механічним пошкодженням кореневих волосків при відмиванні коренів від залишків живильного середовища, через що знижується інтенсивність всмоктування води.

Рослини в умовах закритого ґрунту культивували впродовж 25-30-ти діб, після чого на початку вересня їх висаджували у відкритий ґрунт за схемою 0,25×0,25м. За умови використання такого методичного підходу одержували надзвичайно високу приживлюваність рослин-регенерантів (понад 92%) та активний середньомісячний приріст (10-15 см).

Електромагнітні спектри абсорбції енергії пластидними пігментами показували, що в умовах відкритого ґрунту рослини троянди ефірооїдної у 2,0-2,3 рази збільшують здатність поглинати світло. Основні максимуми поглинання електромагнітної енергії не змінюються. Це свідчить про те, що склад і співвідношення головних пластидних пігментів залишається майже незмінним, проте у складі каротиноїдів зростає доля ксантофілів (рис. 1). Кількісні співвідношення хлорофілів в адаптаційний період пропорційно збільшується. Проте слід зауважити, що при перенесенні рослин, після первинної адаптації, в умови дрібноділяночного дослідження сума хлорофілів зменшувалась (табл.1).

Даний ефект, на нашу думку, у першу чергу пов'язаний із зниженням вологості повітря на фоні підвищеної інсоляції. У відповідь на нові умови зростання у листках рослин активізувався синтез захисної групи пігментів, що відповідно викликало зниження показника співвідношення суми хлорофілів до каротиноїдів.

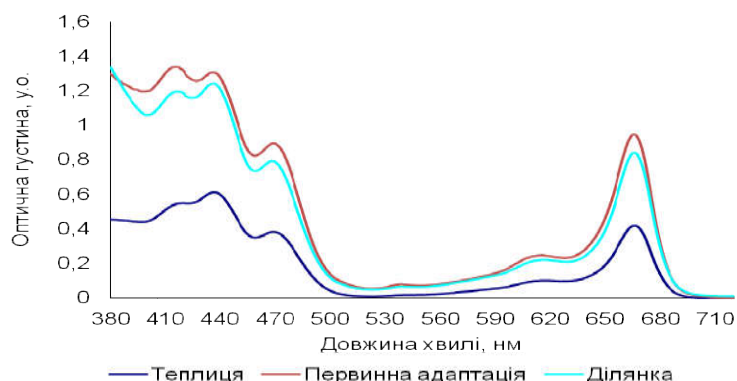


Рис. 1. Електронні спектри хлорофілів і каротиноїдів листків троянди ефіроолійної *in vitro* при адаптації в умовах закритого і відкритого ґрунту

Fig. 1. Electronic spectra of chlorophylls and carotenoids of leaves of rose essential oil *in vitro* with adaptation in closed and open soil

Таблиця 1. Вміст пластидних пігментів у листках в процесі адаптації рослин-регенерантів троянди ефіроолійної після культури *in vitro*

Table 1. Content of plastid pigments in leaves in the process of adaptation of plants-regenerants of rose essential oil after culture *in vitro*

Пігменти та їх співвідношення	Т	ПА	Д
Хла, мг/г	3,7±0,10	8,4±0,02	7,4±0,02
Хл <i>b</i> , мг/г	1,2±0,04	3,3±0,01	2,7±0,03
Хла + <i>b</i>	4,9±0,3	11,7±0,05	10,1±0,06
Хла / <i>b</i>	3,1	2,5	2,7
Кр, мг/г	1,5±0,02	2,8±0,02	3±0,02
Хл (<i>a</i> + <i>b</i>) / Кр	3,3	4,2	3,4

* Хл – хлорофіл, Кр – каротиноїди; Т – у тепличних умовах, ПА – первинна адаптація, Д – в умовах дрібної ділянки; $p \leq 0,05$

Переважає більшість компонентів захисних систем – продукти вторинного метаболізму. Контроль за їх синтезом у значній мірі здійснюється фотоіндуцибельними генами. Синтез фенольних сполук активізується в умовах збільшення у світлі УФ частки спектра (Волинець, 2013).

Поступове збільшення електромагнітного навантаження високоенергетичними потоками призводить до фотохімічного закалювання рослин, внаслідок якого вони набувають здатність трансформувати надлишкову енергію і захищати компоненти клітин від руйнування. Отже на фоні зменшення вмісту хлорофілів у листках в процесі

адаптації рослин в умовах відкритого ґрунту, лінійне зростання у листках загальної кількості фенольних сполук і фенольних антиоксидантів свідчить про мобільність системи їх синтезу (табл.2).

Так кількість загальних фенолів за весь період адаптації збільшився у 6, а катехінів і фенольних антиоксидантів у 7 разів. У даному аспекті доречним виглядає використання ванілінової кислоти у якості активатора фенілпропаноїдного синтезу, для прискорення процесів накопичення захисних метаболітів.

Таблиця 2. Вміст фенольних сполук у листках рослин-регенерантів троянди ефіроолійної в процесі адаптації після культури *in vitro*

Table 2. Content of phenolic compounds in leaves regenerants of roses essential oils in the process of adaptation after culture *in vitro*

Умови адаптації	Феноли	Флавоноїди	Катехіни	АА
Т*	5,3±0,15	1,1±0,05	3,1±0,07	40,5±2,2
ПА	18,0±0,90	3,4±0,14	9,1±0,04	160,4±2,5
Д	32,0±0,25	3,4±0,17	21,3±0,23	279,7±3,4

*Т – адаптація в умовах теплиці; ПА – первинна адаптація рослин до умов *ex vitro*; Д – адаптація в умовах відкритого ґрунту; АА – фенольні антиоксиданти; $p \leq 0,05$

Таким чином, контроль стану рослин-регенерантів в процесі їх адаптації за біохімічними маркерами дозволяє оптимізувати режим дорощування рослин з урахування їх сортоспецифічних властивостей. Розробка референтних методів контролю стану рослин за пігментних складом, кількісними і якісними показниками продуктів вторинного метаболізму із застосуванням методів вимірювання флуоресценції хлорофілів дозволяє створювати системи сортоадаптацій регенерантів.

Висновки:

- 1) Найкращим способом адаптації та дорощування рослин перед закладанням плантацій є метод адаптації в умовах теплиці за використання суміші торф:перліт (2:1), що сприяє швидкій приживлюваності клонів. Оптимальними для перенесення в умови *in vivo* є регенеранти висотою не менше 3,5 см.
- 2) Найвдалішим періодом перенесення рослин з умов *in vitro* до умов *in vivo* є кінець травня – початок червня, а з умов *in vivo* до *ex vitro* є кінець липня – початок серпня.
- 3) Встановлено, що склад і співвідношення головних пластидних пігментів залишається майже незмінним, проте у складі каротиноїдів зростає доля ксантофілів. Кількість загальних фенолів за весь період адаптації збільшилась у 6, а катехінів і фенольних антиоксидантів у 7 разів.

Список літератури

1. Вольнец А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений / А.П. Вольнец. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 283 с.
2. Дедюхина О.Н., Константинова А.С., Баранова О.Г. Адаптация растений-регенерантов к почвенным условиям // Вестник удмуртского университета. 2011. – Вып. 3. С. 31–35.
3. Зарубина М.А., Гуева Н.И., Балашова Н.Н., Маслоброд С.Н., Игуменов В.А. Адаптивные реакции культурных растений на биотические и абиотические стрессы // Сельскохозяйств. биология. – 1988. – № 20. – С. 111–117.

4. Кушнір Г.П., Сарнацкая В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наукова думка, 2005. – 273 с.
5. Лемпичкий Л.П. Культура троянд у відкритому ґрунті. —К.: Вид-во АН УРСР, 1958. — 123с.
6. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений – К.: Наукова думка, 1976. – 336 с.
7. Ginova, A., I. Tsvetkov and V. Kondakova Rosa damascena Mill. an overview for evaluation of propagation methods // Bulg. J. Agric. Sci. – 2012. – Vol. 18. – P. 545–556.

References

1. Volynets, A.P. Fenolnye soedyneniya v zhyznedeiatelnosti rastenyi [Phenolic compounds in plant life]. – Minsk: Belarus. navuka, 2013 – 283 p. (In Russian).
2. Dedyukhyna O.N., Konstantinova A.S., Baranova O.G. Adaptatsyya rastenyi-rehenerantov k pochvennym uslovyyam. [Adaptation of plants-regenerants to soil conditions] // Vestnyk udmurtskoho universiteta. – 2011. – 3. – P. 31–35. (In Russian).
3. Zarubina M.A., Guiev N.I., Balashov N.N., Maslobrod S.N., Igumenov V.A. Adaptivnyye reaktsyy kul'turnykh rastenyi na byotycheskye y abyotycheskye stressy [Adaptive reactions of cultivated plants to biotic and abiotic stresses] // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. – 1988. – 20. – P. 111–117. (In Russian).
4. Kushnir H.P., Sarnatskaia Mikroklonalne rozmnozheniia roslin. [Micropropagation of plants]. – K.: Naukova dumka, 2005. – 273 p. (In Ukrainian).
5. Lempitskyi L.P. Kultura troiand u vidkrytomu hruntі. [Culture roses in the ground]. – K.: Vyd-vo AN URSR, 1958. – 123p. (In Russian).
6. Pochynok, Kh. N. Metody byokhymycheskoho analiza rastenyi [Methods of biochemical analysis of plants]. – K.: Naukova dumka, 1976. – 336p. (In Russian).
7. Ginova, A., I. Tsvetkov and V. Kondakova Rosa damascena Mill. an overview for evaluation of propagation methods. // Bulg. J. Agric. Sci. – 2012. – Vol. 18. – P. 545–556.

STATE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF ROSE ESSENTIAL OIL AFTER ADAPTATION TO CONDITIONS *IN VIVO*

O. Oliynyk, M. Melnychuk

For effective adaptation clones of rose essential oil grade Lan was chosen optimal conditions in vivo and the type of substrate. The best way to adapt and grow plants, before laying plantations, is to adapt in greenhouse conditions using a mixture of peat and perlite (2:1), which promotes the rapid elongation of the clones. Regenerates with a height of less than 3.5 cm are optimal for transferring to in vivo conditions. The most successful period of plants transplantation from in vitro to in vivo conditions is the end of May - the beginning of June, and from in vivo to ex vitro conditions the end of July - the beginning of August. Electromagnetic absorption spectra of energy by plastidic pigments show that plants in the conditions of open soil of roses essential oils increase the ability to absorb light in 2,0-2,3 times. The main maxima of absorption of electromagnetic energy do not change. The ratio of chlorophylls to the adaptation period is proportional to the increase. When the plants are transferred to small plots, after the initial adaptation, the amount of

chlorophylls decreases. The leaves of plants intensified the synthesis of the protective group of pigments, due to new conditions of growth. This caused a decrease in the ratio of the sum of chlorophylls to carotenoids. Linear growth in the leaves of the total amount of phenolic compounds and phenolic antioxidants indicates the mobility of their system. The number of total phenols increased by 6 times, and catechins and phenolic anti-oxidants by 7 times over the entire period of adaptation. As a consequence, it is appropriate to use vanillin acid as a phenylpropanoid synthesis activator to accelerate the process of accumulation of protective metabolites. Thus, monitoring of the state, regenerates of plants during their adaptation by biochemical markers allows optimization of the control regime of plants, with their varietal specific properties. Development of reference methods for controlling the state of plants: by pigment composition, quantitative and qualitative indicators of secondary metabolism products using fluorescence measurement methods of chlorophylls - allows to create soratoadaptation systems.

Key words: adaptation, substrate, in vivo, rose essential oil

Отримано редколегією 14.11.2017