

ISSN 0558 - 1125

УДК 581.143.6+572.021.1

Т.В. МЕДВЕДЄВА, кандидат біол. наук
Інститут садівництва (ІС) НААН, Київ, Україна

ВИКОРИСТАННЯ АКВАКУЛЬТУРИ ДЛЯ АКЛІМАТИЗАЦІЇ КУЛЬТИВОВАНИХ IN VITRO РОСЛИН

T.V. MEDVEDYEVA, PhD
Institute of Horticulture, NAAS, Kyiv, Ukraine

USE OF THE AQUACULTURE FOR THE MICROPROPAGATED PLANTS ACCLIMATION

Специфічні умови культури in vitro зумовлюють формування мікропагонів з порушеними морфологічною та анатомічною структурою та фізіологічними процесами. Після перенесення з культивувальних посудин в культуру ex vitro такі рослини можуть пошкоджуватися через зміну умов культивування. Тому вони вимагають акліматизації для коригування анатомічних і фізіологічних змін. Автор пропонує використовувати аквакультуру як один із способів акліматизації мікропагонів після культури in vitro.

Специфические условия культуры in vitro обуславливают формирование микропобегов с нарушенными морфологической и анатомической структурой и физиологическими процессами. После перенесения из культивационных сосудов в культуру ex vitro такие растения могут повреждаться вследствие изменения условий культивирования. Поэтому они требуют акклиматизации для корректировки анатомических и физиологических изменений. Автор предлагает использовать аквакультуру как один из способов акклиматизации микропобегов после культуры in vitro.

The special conditions of the in vitro culture cause the formation of plantlets with abnormal morphology, anatomy and physiology. After transfer from the cultivation vessels to the ex vitro culture such plantlets may be damaged because of the changes in cultivation conditions, and so demand a period of acclimation to correct the anatomical and physiological abnormalities. The author offers the use of the aquaculture as one of methods of micropropagated plants acclimation.

Спосіб мікроклонування рослин, що базується на активації пазушних меристем шляхом зняття апікального домінування, набув широкого використання для швидкого розмноження генетично однорідного матеріалу багатьох видів, особливо для отримання цінних сортів, вільних від вірусів [1, 2]. Але його застосування часто обмежується високим відсотком рослин, втрачених чи пошкоджених при перенесенні в умови *ex vitro* (у теплицю чи в поле). Акліматизація є фінальним і необхідним кроком в усій схемі мікроклонального розмноження, що включає введення експлантатів в культуру *in vitro*, активну проліферацію, вкорінення та перенесення рослин – регенерантів в умови *ex vitro*. Для акліматизації в умовах *ex vitro* необхідно забезпечити ряд оптимальних фізичних факторів, щоб виконати поступовий перехід мікропагонів з *in vitro* в умови навколишнього середовища. Ці фактори – адекватний субстрат (торф, перліт чи різноманітні суміші), вологість повітря, вентиляція та кислотно-лужний баланс (рН). У більшості випадків для акліматизації використовують твердий субстрат, а вологість повітря забезпечують штучним туманом або захищають культури прозорими кришками чи вологими тентами.

Значні зусилля були спрямовані на оптимізацію умов акліматизації рослин, розмножених в умовах *in vitro* [3]. Однак ця стадія залишається основним вузьким місцем при мікроклональному розмножуванні багатьох видів і сортів рослин і вивчення способів підвищення її ефективності є досить актуальним.

Методика. Дослідження проводили у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААН. Об'єктами служили рослини суниці садової (*Fragaria x ananassa* Duch.) сортів Геркулес та Янтарна (селекція вказаного інституту), ожини (*Rubus fruticosus* L.) сортів Торнфрі та Блек сетин і мінітроянди (*Rosa chinensis* Jacq. var. *minima*) сорту Ред Моцарт. Базальне середовище для проліферації рослин містило солі та вітаміни за Мурасіге і Скугом (MS) [4], 30 г/л сахарози та 7 г/л агару, рН 5,6-5,8. Концентрація екзогенного цитокініну (6-бензиламінопурину (БАП) варіювала по культурах (від 0,5 мг/л до 2,0 мг/л). Для вкорінення мікропагонів в умовах *in vitro* цитокінін видаляли з середовища, натомість додавали ІМК (1,0 мг/л). Рослини, укорінені в умовах *in vitro*, були обережно видалені з культиваційних посудин, а їх корені ретельно відмиті в теплій воді від залишків агаризованого середовища. Рослини вставляли в отвори, зроблені в пінопластовій пластині, яку вміщували у пластикову кювету, що містила шар водопровідної води 2-3 см, який не перевищував рівень коріння, і культивували при температурі 22° С, освітленні 2,5-3 тис. люкс, фотоперіоді 16/8 годин і вологості повітря 50-60% без накриття, у безпосередньому контакті з навколишнім середовищем.

Результати досліджень. Умови культивування рослин у теплиці та в культурі *in vitro* мають ряд відмінностей: інтенсивність і якість освітлення, рівень відносної вологості, склад газового середовища, поживні елементи і регулятори росту, субстрат для культивування [5]. Значно відрізняється процедура вкорінення – у теплицях на короткий час занурюють живці у розчин ауксину високої концентрації, надлишки якого потім вимиваються з добре аерованого субстрату. При вкоріненні *in vitro* мікропагони культивують кілька тижнів на агаризованому поживному середовищі з низькою концентрацією ауксину та низькою аерацією. Тому не дивно, що перенесення їх з *in vitro* в теплицю незалежно від того, вкорінені вони чи ні, супроводжується стресом, уповільненим ростом і значними втратами рослинного матеріалу [6]. Протягом процесу акліматизації мікропагони, отримані в культурі *in vitro*, повинні адаптуватися до нових умов росту – при нижчій відносній вологості, вищій інтенсивності освітлення, коливанні температури та постійній загрозі контамінації патогенами. Дуже часто зневоднення і в'янення є основними причинами низького відсотка приживлюваності мікропагонів в *ex vitro*. За деякими оцінками, лише 25% регенерованих *in vitro* мікропагонів можуть бути успішно пересадженими в тепличні і ще менше в польові умови через причини, які пов'язані з їх недосконалими анатомічними і фізіологічними характеристиками:

- недорозвинута чи неактивна воскова кутикула листка;
- пошкоджений продиховий механізм, у якому ненормально орієнтовані мікрофібрили;
- низька фотосинтетична активність;
- вітрифікація мікропагонів, що до певної міри зумовлена нерозвинутою восковою кутикулою та недостатньою диференціацією васкулярної тканини;
- слабкий судинний зв'язок між коренем і пагоном, що перешкоджає поглинанню і транспорту води та елементів живлення з першого в останній;
- недорозвинуті або відсутні кореневі волоски.

Всі ці та інші чинники призводять до великого процента втрат протягом акліматизації [7].

Для акліматизації мікропагонів, розмножених в культурі *in vitro*, застосовуються дві основні стратегії, що базуються на зменшенні водного стресу при зміні умов культивування і стимулюванні фотоавтотрофного росту цієї культури. Позбавити мікропагони від цього стресу дає можливість акліматизація з використанням аквакультури, що позитивно впливає на відсоток адаптованих рослин. Цей метод виявився високоефективним для акліматизації вкорінених рослин суниці обох досліджуваних сортів (Геркулес і Янтарна). Через 3 тижні культивування в рідкому субстраті 100% рослин були успішно пересажені в горщики і виставлені для адаптації на вегетаційний майданчик (рис.1).



А - вкорінені в культурі *in vitro* рослини



Б – акліматизація



В – утворення нових коренів



Г – акліматизовані рослини

Рис.1. Стадії акліматизації суниці садової в аквакультурі

За цей час спостерігали утворення нових корінців і нових листочків, тобто рослини розвивались активно, їх ріст не сповільнювався. Вода в кюветах залишалася прозорою, не спостерігалось її побуріння і відпадала потреба в заміні на свіжу. Але через випаровування та поглинання рослинами доводилося регулювати її об'єм.

При акліматизації в такий спосіб сортів ожини Торнфрі і Блек сетин було випробувано два варіанти: в одному рослини були вкорінені, а в другому ні. В останньому варіанті ми спробували сумістити вкорінення та акліматизацію, додавши у воду індолілмасляну кислоту у концентрації 1 мг/л для гормональної стимуляції ризогенезу. В першому випадку (рис. 2) через два тижні 100% рослин були успішно акліматизовані і пересажені в горщики. Подібного результату акліматизації у гідрокультурі сорту Торнлес евергрін досягли протягом місяця дослідники в Румунії [8].

У другому варіанті процеси вкорінення та акліматизації тривали близько місяця, спостерігалось побуріння води в кюветах і розчин доводилось міняти на свіжий один раз на тиждень. Загальний вихід висаджених у горщики рослин становив 60 (Торнфрі) - 70% (Блек сетин). Більшість комерційних лабораторій не вкорінюють мікропагони *in vitro*, оскільки цей процес трудомісткий і вимагає додаткових коштів. Укорінення *in vitro* складає приблизно 35-75% загальної вартості мікроклонального розмноження [9]. Такі витрати можна значно скоротити, якщо цей процес сумістити з акліматизацією. Випробуваний нами спосіб дає можливість з'єднати дані процеси в один, але для підвищення його ефективності дослідження треба продовжити.



А – матеріал для акліматизації

Б – кювети з водою для акліматизації

Г – результат акліматизації

Рис. 2. Укорінення та акліматизація рослин ожини *Rubus fruticosus* L.

Рослини мінітроянди сорту Ред Моцарт, укорінені на середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 1,0 мг/л ауксину, також були високоефективно акліматизовані в аквакультурі (рис.

3). Вихід їх склав 80% за рахунок високих сильних рослин з добре розвинутою кореневою системою. Мікропагони, в яких були слаборозвинені корінці, розвивалися повільно і врешті-решт загинули. Процес акліматизації тривав 3 тижні.



Рис. 3. Акліматизація рослин мінітроянди сорту Ред Моцарт

Висновки. Запропонований нами спосіб акліматизації в аквакультурі виявився високоефективним для всіх культур, випробуваних у даному дослідженні. З його допомогою можна отримувати сильнорозвинені рослини суниці, ожини та мініатюрної троянди, придатні для пересаджування в горщики і подальшого пристосування до умов навколишнього середовища. Він дає можливість зменшити трудові та фінансові витрати, оскільки не потребує створення штучного туману, спеціальних субстратів, накриття та періодичного провітрювання рослин, які знаходяться в безпосередньому контакті з довкіллям з першої хвилини акліматизації. Ми також пропонуємо випробування цього способу для оптимізації умов укорінення та акліматизації як єдиного процесу та для розширення спектра культур, які можуть бути акліматизовані таким чином.

Список використаної літератури

1. Gamborg O.L. Plant tissue culture. Biotechnology milestones // *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2002. – 38. – P. 84-92.
2. Read P.E. Micropropagation: Past, Present and Future // *Acta Hort. (ISHS).* – 2007. – 748. – P. 17-27.
3. Медведєва Т.В. Проблеми акліматизації культивованих *in vitro* рослин // *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, Т.40.- 2008.- №4.- С. 299-309.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum.*–1962. – 15. – P. 473-497.
5. Balla I., Vértesy J., Végváry Gy., Szűcs E., Kállay T., Vörös I., Bíró B. Nutrition of the micropropagated fruit trees *in vitro* and *ex vitro* // *Int. Journal of Hort. Sci.* – 2003. – 9(2). – P.43-46.
6. Seelye J.F., Burge G.K., Morgan E.R. Acclimatizing tissue culture plants: reducing the shock // *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society.* - 2003.- 53.- P.85-90.
7. Pospíšilová J., Synková H., Haisel D., Semoradova S. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review) // *Acta Hort.* -2007.- 748.- P. 29-38.

8. Alexandru Fira, Doina Clapa *Ex-Vitro* Acclimation of some Horticultural Species in Hydroculture // Bulletin UASVM Horticulture.-2009. - 66(1). - P. 44-50.
9. Kozai T., Zobayed S.M.A. Acclimatization // Spier R.(ed). Encyclopedia of cell technology. New York: Wiley, 2000.- P. 1-12.

Одержано редколегією 28.04.12